

CAROLINA LANDIM DA COSTA E SILVA

**ESTUDO DE POLIMORFISMO DE DNA DO GENE CODIFICADOR
DA LOXL-1 E PROLAPSO DE ÓRGÃOS PÉLVICOS EM
MULHERES BRASILEIRAS**

Tese apresentada à Universidade
Federal de São Paulo – Escola Paulista
de Medicina para obtenção do Título de
Mestre em Ciências

São Paulo

2019

CAROLINA LANDIM DA COSTA E SILVA

**ESTUDO DE POLIMORFISMO DE DNA DO GENE CODIFICADOR
DA LOXL-1 E PROLAPSO DE ÓRGÃOS PÉLVICOS EM
MULHERES BRASILEIRAS**

Tese apresentada à Universidade
Federal de São Paulo – Escola Paulista
de Medicina para obtenção do Título de
Mestre em Ciências

Orientador: Prof. Dr. Rodrigo de Aquino Castro

Coorientadora: Dra. Maria Augusta Tezelli Bortolini

São Paulo

2019

Costa e Silva, Carolina Landim da

Estudo de polimorfismo de DNA do gene codificador da LOXL-1 e prolapso de órgãos pélvicos em mulheres brasileiras. / Carolina Landim da Costa e Silva – São Paulo, 2019.

xii, 78f.

Tese (Mestrado) – Universidade Federal de São Paulo. Escola Paulista de Medicina. Programa de pós-graduação em Ginecologia.

Título em inglês: LOXL-1 polymorphism in Brazilian women with and without pelvic organ prolapse.

Palavras-chave: 1. Prolapso de órgão pélvico. 2. Polimorfismo. 3. Colágeno. 4. Lisiloxidase. 5. Matriz extracelular.

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO PAULO
ESCOLA PAULISTA DE MEDICINA
Departamento de Ginecologia

Chefe do Departamento:

Prof. Dra. Marair Gracio Ferreira Sartori

Coordenador do Curso de Pós-Graduação:

Prof. Dr. Afonso Celso Pinto Nazário

Carolina Landim da Costa e Silva

**Estudo de polimorfismo de DNA do gene codificador da LOXL-1 e prolapso
de órgãos pélvicos em mulheres brasileiras**

Presidente da banca:

Prof. Dr. Rodrigo de Aquino Castro

Universidade Federal de São Paulo – Escola Paulista de Medicina (EPM/UNIFESP)

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dra. Andreisa Paiva Monteiro Bilhar

Prof. Dr. Emerson de Oliveira

Prof. Dr. Luiz Gustavo Oliveira Brito

Prof. Dra. Raquel Martins Arruda

*Dedico este trabalho à minha amada família.
É através de vocês que sinto a presença de Deus.
Graças a vocês sei que posso ir além.*

AGRADECIMENTOS

Aos meus orientadores, Prof. Dr. Rodrigo de Aquino Castro e Dra. Maria Augusta Tezelli Bortolini, pela oportunidade de desenvolver este projeto. Vocês são exemplos de competência, dedicação e pioneirismo.

Às colegas Nilce Coimbra Batista, Renata G. M. dos Santos, Fernanda C. A. Pepicelli, Juliana Barbosa Teixeira e Rebecca Sotelo P. da Silva, pela destreza, disponibilidade e empenho.

SUMÁRIO

Dedicatória.....	v
Agradecimentos.....	vi
Lista de figuras.....	viii
Lista de tabelas.....	ix
Lista de abreviaturas e siglas.....	x
Resumo.....	xi
Abstract.....	xii
1 INTRODUÇÃO.....	1
1.1 Definição e Epidemiologia.....	2
1.2 Etiologia e Fisiopatologia.....	3
1.3 Classificação e estadiamento do prolapso de órgãos pélvicos.....	5
1.4 Sustentação e suporte do assoalho pélvico.....	8
1.5 Tecido Conjuntivo.....	10
1.6 Matriz extracelular.....	11
1.7 Colágeno.....	11
1.8 Elastina.....	13
1.9 Lisiloxidases.....	15
1.10 Polimorfismo de nucleotídeo único.....	18
1.11 Genética e prolapso de órgãos pélvicos.....	19
2 OBJETIVOS.....	22
3 MATERIAL E MÉTODOS.....	24
3.1 Recrutamento de pacientes.....	25
3.2 Extração de DNA Genômico.....	26
3.3 Análise de Polimorfismos por Real-Time PCR.....	29
3.4 Análise Estatística.....	32
3.5 Artigo enviado para publicação.....	33
4 RESULTADOS.....	48
5 DISCUSSÃO.....	54
6 CONCLUSÃO.....	60
7 ANEXOS.....	62
8 REFERÊNCIAS.....	71

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 –	Classificação de POP-Q.....	7
Figura 2 –	Prolapso estadiamentos 0, I, II, III, e IV segundo POP-Q, sendo o colo uterino o ponto de maior prolapso.....	8
Figura 3 –	No nível I, o paracolpo suspende a vagina a partir das paredes pélvicas laterais. Fibras do nível I estendem-se tanto verticalmente quanto também para trás em direção ao sacro. No nível II, a vagina é ligada ao arco tendíneo da fáscia pélvica e fáscia superior dos músculos levantadores do ânus.....	9
Figura 4 –	Os polimorfismos de um único nucleotídeo (SNPs) são variações de base única entre diferentes pessoas.....	18
Figura 5 –	A - Sangue coletado / B - Alo leucocitário aparente após centrifugação / C - Retirada da fase leucocitária.....	26
Figura 6 –	Sequência de extração de DNA a partir da fase leucocitária, segundo protocolo do kit GE®	28
Figura 7 –	A – Aparelho Nanodrop 2000, que fica conectado ao computador através de software específico / B – Gráfico do software após leitura da amostra, mostrando concentração de DNA e sua relação de pureza.....	29
Figura 8 –	Montagem da placa para reação de RT-PCR.....	30
Figura 9 –	Gráfico de análise de resultados do RT-PCR pelo <i>programa Step One Plus Real Time PCR System</i>	31

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 –	Comparação entre Desenvolvimento da doença em relação às variáveis.....	50
Tabela 2 –	Modelo de regressão logística multivariado, considerando como fatores de risco para o desenvolvimento da doença apenas as variáveis que apresentam relação significativa nas comparações univariadas entre grupos e que são clinicamente importantes.....	52
Tabela 3 –	Análise de Hardy-Weinberg (Cálculo do Equilíbrio de Hardy-Weinberg), com frequências observadas e esperadas dos genótipos relativos à LOXL-1 nos grupos (caso e controle).....	53

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AUGS	<i>American Urogynecologic Society</i>
CP	Corpo Perineal
CVT	Comprimento Vaginal Total
DM	Diabetes Mellitus
HAS	Hipertensão Arterial Sistêmica
HG	Hiato Genital
HW	Hardy-Weinberg
ICS	<i>International Continence Society</i>
IU	Incontinência Urinária
IUE	Incontinência Urinária de Esforço
IUM	Incontinência Urinária Mista
IUU	Incontinência Urinária de Urgência
LOXL-1	Gene Lysyl Oxidase-1
MEC	Matriz Extracelular
MFS	Síndrome de Marfan
MMP	Metaloproteinase de Matriz
POP	Prolapso de Órgãos Pélvicos
POP-Q	Quantificação de Prolapso de Órgãos Pélvicos
SNP	Polimorfismo de Nucleotídeo Único
TCLE	Termo de Consentimento Livre e Esclarecido
XFG	Glaucoma de Esfoliação
XFS	Síndrome de Esfoliação

RESUMO

Introdução e hipótese: Verificamos a presença do polimorfismo de nucleotídeo único (SNP) rs2165241 do gene lysyl oxidase-1 (LOXL-1) e a associação com prolapso de órgãos pélvicos (POP) em mulheres brasileiras e determinamos os fatores de risco para o desenvolvimento de POP. **Métodos:** Avaliamos 630 mulheres na pós-menopausa divididas nos grupos POP (estágios III e IV) e controle (estágios 0 e I) através de exame físico e coleta de amostra de sangue periférico. A sequência de DNA de interesse foi analisada por reação em cadeia da polimerase via transcriptase reversa em tempo real (RT-PCR). Utilizamos modelos de regressão logística para a análise, com $p < 0,05$ para significância. **Resultados:** Não houve associação entre o polimorfismo analisado e o POP. Análise de regressão logística múltipla identificou idade [odds ratio (OR) = 1,09, intervalo de confiança (IC) 95% = 1,07; 1,12], número de partos vaginais (OR = 2,17, IC 95% = 1,67; 2,82) e histórico familiar (OR = 2,27, IC 95% = 1,41; 3,66) como fatores de risco independentes para POP. A cesárea mostrou-se um fator de proteção (OR = 0,73, IC 95% = 0,56; 0,95). **Conclusão:** Nosso estudo sugere a falta de associação entre polimorfismo rs2165241 da LOXL-1 e POP avançado nesta população.

ABSTRACT

Introduction and hypothesis: We verified the presence of single nucleotide polymorphisms (SNP) rs2165241 of the lysyl oxidase-like 1 (LOXL-1) gene and the association with pelvic organ prolapse (POP) in Brazilian women and determined risk factors for POP development. **Methods:** We assessed 630 postmenopausal women divided into POP (stages III and IV) and control (stages 0 and I) groups by examination and peripheral blood sample collection. DNA sequence of interest was analyzed by real-time reverse-transcriptase polymerase chain reaction (RT-PCR). We used logistic regression models for the analysis, with $p < 0.05$ for significance. **Results:** There were no association between the polymorphism analyzed and POP. Multiple logistic regression analysis identified age [odds ratio (OR) = 1.09, confidence interval (CI) 95% = 1.07; 1.12], number of vaginal births (OR = 2.17, CI 95% = 1.67; 2.82), and family history (OR = 2.27, CI 95% = 1.41; 3.66) as independent risk factors for POP. Cesarean section was shown to be a protective factor (OR = 0.73, CI 95% = 0.56; 0.95). **Conclusion:** Our research suggests that there is a lack of association between DNA polymorphism rs2165241 of LOXL-1 with advanced POP in this population.

1 INTRODUÇÃO

1.1 Definição e Epidemiologia

Prolapso de órgãos pélvicos (POP), incontinência urinária (IU) e outras anormalidades sensoriais e de esvaziamento do trato urinário inferior configuram um grupo de condições chamado de distúrbios do assoalho pélvico.⁽¹⁾ Essas condições comuns afetam de 27 a 50% das mulheres de 40 anos ou mais.⁽²⁾

A descida da parede vaginal anterior, parede vaginal posterior, do útero (colo) ou ápice da vagina (cúpula) é definida como prolapso de órgão pélvico. A sintomatologia inclui sensação de pressão pélvica, protusão vaginal, sangramento e lombalgia e costuma surgir quando as estruturas atingem ou ultrapassam o anel himenal.⁽³⁾

Estima-se que 50% das mulheres multíparas têm algum grau de POP, mas apenas 10% a 20% procuram avaliação e tratamento para sua condição.⁽⁴⁾ Ao exame pélvico, a prevalência de POP pode variar entre 30% e 40%. Estudos epidemiológicos mostram que 6 a 8% das pacientes relatam sensação de abaulamento na vagina⁽⁵⁾ e 3 a 6% apresentam prolapso que ultrapassa o introito vaginal no exame pélvico de rotina.⁽²⁾

Como a prevalência de prolapso de órgão pélvico aumenta com a idade, espera-se um número crescente de mulheres afetadas com a evolução demográfica da população mundial. Apesar de não serem condições que ameaçam a vida, os distúrbios do assoalho pélvico podem ter um impacto negativo significativo na qualidade de vida, muitas vezes com implicações graves sobre a função diária, sexualidade e saúde mental, além de altos custos.^(6,7)

Análise realizada nos Estados Unidos, com base nas taxas de cirurgia de 2007-2011, encontrou um risco ao longo da vida de sofrer uma cirurgia para incontinência urinária de esforço ou para prolapso de órgão pélvico de 20% aos 80 anos. Separadamente, o risco cumulativo para cirurgia de prolapso de órgãos pélvicos foi de 12,6%.⁽⁸⁾ Aproximadamente 30% das operações realizadas são reoperações.⁽⁹⁾

As pacientes tratadas cirurgicamente representam apenas uma pequena fração das pacientes afetadas, porque muitas mulheres com essas condições são seguidas de forma conservadora ou nunca irão apresentar-se para avaliação. A incidência de prolapso e incontinência geridos cirurgicamente é influenciada por variáveis como condições financeiras de pacientes e prestadores de cuidados de saúde e o acesso a cuidados médicos.⁽¹⁰⁾

1.2 Etiologia e Fisiopatologia

A etiologia do POP não está claramente definida. Vários fatores parecem estar associados ao seu surgimento, como parto vaginal, hipoestrogenismo, macrosomia fetal, uso de fórceps e vácuo-extrator, histerectomia e cirurgias prévias para correção de distopia genital.⁽¹¹⁻¹³⁾

Estudo realizado em população brasileira encontrou a presença de pelo menos um parto normal, macrosomia fetal e história familiar positiva para distopia como fatores de risco independentes para prolapso genital nesta amostra. O parto cesariano se mostrou como fator protetor.⁽¹⁴⁾

O parto vaginal pode causar lesões transitórias e/ou de longo prazo à vagina e demais tecidos de suporte do assoalho pélvico.⁽¹⁵⁾ Dados epidemiológicos sugerem que o parto vaginal é o maior fator de risco independente para o desenvolvimento de distúrbios do assoalho pélvico.⁽¹⁵⁻²⁰⁾

Porém, existem relatos conflitantes sobre a influência da paridade, trabalho de parto e via de parto no desenvolvimento de distúrbios do assoalho pélvico. Lukacz et al., encontraram que o risco de distúrbios do assoalho pélvico é independentemente associado ao parto vaginal, mas não com paridade sozinha. Já o parto cesáreo tem um efeito protetor, semelhante à nuliparidade, no desenvolvimento desses distúrbios quando comparado ao parto vaginal.⁽¹⁹⁾

O'Boyle et al., observaram que a gestação por si só, associou-se ao aumento da incidência de POP em mulheres grávidas nulíparas em comparação com mulheres nuligestas.⁽²¹⁾

É notável que nem todas as mulheres que se submetem a parto vaginal tem POP acentuado, e que POP acentuado e incontinência urinária são descritos em mulheres nulíparas.⁽²²⁾ Uma das razões para esses resultados conflitantes pode ser o fato de que nem todas as mulheres são igualmente suscetíveis ao prolapso.⁽²³⁾

Bump e Norton dividiram os diferentes fatores de risco para disfunções do assoalho pélvico em fatores predisponentes – fatores hereditários, gênero, raça, distribuição de colágeno, ambiente; fatores desencadeantes - parto vaginal, dano muscular ou nervoso, irradiação, cirurgia radical; fatores promotores – menopausa, obesidade, constipação, tabagismo, infecção, cirurgia, doença pulmonar, estresses ocupacionais e recreativos; e fatores que causam descompensação – envelhecimento, demência, ambiente, debilidade.⁽²⁴⁾

Enquanto mulheres com poucos, ou nenhum fator de risco, podem desenvolver POP, às vezes até em idade precoce, algumas mulheres com múltiplos fatores de risco nunca o desenvolvem.⁽²³⁾ É provável que a disfunção seja de causa multifatorial atribuível à combinação de fatores, e variando de paciente para paciente.⁽²⁵⁾ Dados recentes sugerem que predisposição genética pode contribuir para esta condição.⁽²⁶⁾

Trabalhos sugerem prevalência de distúrbios do assoalho pélvico em determinadas condições genéticas, como Ehlers-Danlos e síndrome de Marfan, caracterizadas por defeitos do colágeno e do tecido conjuntivo.⁽²⁷⁾ Mesmo que as mulheres com essas anormalidades do tecido conjuntivo representem uma minoria de pacientes com POP, a alta prevalência de disfunção do assoalho pélvico nesses indivíduos, juntamente com os achados de estudos em animais, sugere que uma anormalidade na homeostase de elastina pode contribuir para o desenvolvimento de POP em mulheres fenotipicamente normais.⁽²⁶⁾

Lince et al., em uma metanálise, encontraram um risco substancialmente aumentado de POP em caso de história familiar positiva. Dos 16 trabalhos

incluídos, apenas dois estudos não encontraram uma diferença estatisticamente significativa na prevalência de história familiar positiva entre mulheres com POP e mulheres sem essa condição.⁽²³⁾

Miedel et al. encontraram que, além da idade e paridade, excesso de peso, histórico de condições sugestivas de tecido conjuntivo deficiente (varizes / hérnia / hemorroidas), história familiar de prolapso, levantamento de peso e presença de constipação, fezes endurecidas ou dificuldade de evacuação estavam todos relacionados independentemente, significativamente e positivamente à presença de prolapso sintomático.⁽²⁸⁾

Buchsbaum et al. encontraram alta concordância do prolapso de órgãos pélvicos em pares de irmãs nulíparas e mulheres já submetidas a parto, sugerindo uma predisposição familiar para o desenvolvimento dessa condição. No entanto, o parto vaginal parece conferir um risco para o prolapso de órgãos pélvicos mais avançado.⁽²⁹⁾

A causa da disfunção do assoalho pélvico no nível molecular é desconhecida. As estratégias preventivas não são amplamente praticadas e a cirurgia continua sendo uma terapia comum, em uso há mais de 100 anos.⁽³⁰⁾

Assim como a identificação de fatores de risco ambientais potencialmente modificáveis, o conhecimento de susceptibilidade genética pode fornecer informações sobre a patogênese do prolapso de órgãos pélvicos e favorecer a prevenção e intervenção desta condição.^(7,31)

1.3 Classificação e estadiamento do prolapso de órgãos pélvicos

A descrição clínica da anatomia do assoalho pélvico é determinada durante o exame físico da genitália externa e canal vaginal.⁽¹¹⁾ O sistema de quantificação de prolapso de órgãos pélvicos (POP-Q) refere-se a um sistema objetivo e específico para descrever, quantificar e estadiar o suporte pélvico em mulheres. Aprovado pela International Continence Society (ICS), a American Urogynecologic

Society (AUGS) e a Society of Gynecologic Surgeons para a descrição do prolapso de órgãos pélvicos femininos, ele fornece uma ferramenta padronizada para documentar, comparar e comunicar conclusões clínicas com confiabilidade comprovada entre observadores.⁽³²⁾

Nesse sistema de classificação existem seis pontos que estão localizados com referência ao plano do hímen: Aa, Ba, C, D, Ap, Bp. Cada um é medido em centímetros acima ou proximal ao hímen (número negativo) ou centímetros abaixo ou distal ao hímen (número positivo), sendo o plano do hímen definido como zero (0). Há ainda outros três pontos de referência: hiato genital (HG), comprimento vaginal total (CVT) e corpo perineal (CP).^(3,11,32)

Pontos Aa e Ap: localizados na linha média da parede vaginal anterior e posterior, respectivamente, 3 cm proximal ao anel himenal.

Pontos Ba e Bp: representam o ponto mais distal do prolapso anterior e posterior, respectivamente.

Ponto C: representa o ponto mais distal do colo do útero ou da cúpula vaginal em caso de histerectomia total.

Ponto D: representa a localização do fórnice posterior da vagina e identifica o local presumido de inserção dos ligamentos uterossacros no colo uterino. É omitido na ausência de colo.

HG: é medido a partir do meio do meato uretral externo para o hímen da linha média posterior.

CP: medido a partir da margem posterior do hiato genital para a abertura do ânus.

CVT: é a maior profundidade da vagina em centímetros quando o ponto C ou D é reduzido a sua posição normal completa.

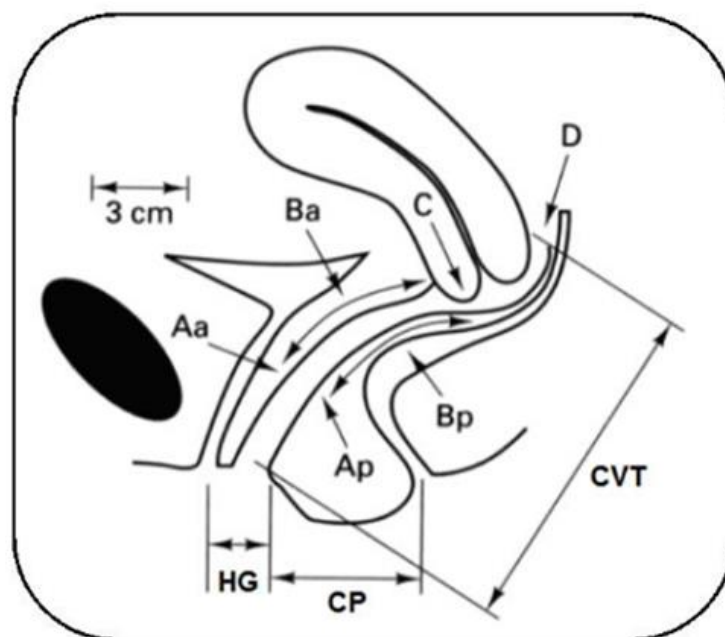


Figura 1 – Classificação de POP-Q. (Adaptada de Persu et al., 2011).

Prolapso de órgão pélvico - (POPQ) – estadiamento³ (Figura 2):

Estadio 0: nenhum prolapso é demonstrado.

Estadio I: a porção distal do prolapso está mais de 1 cm acima do nível do hímen.

Estadio II: a porção mais distal do prolapso é situado entre 1 cm acima do hímen e 1 cm abaixo do hímen.

Estadio III: a porção mais distal do prolapso está mais de 1 cm além do plano do hímen, mas evertida pelo menos 2 cm menos do que o comprimento total vaginal.

Estadio IV: Eversão completa ou eversão pelo menos dentro de 2 cm do comprimento total do genital inferior.

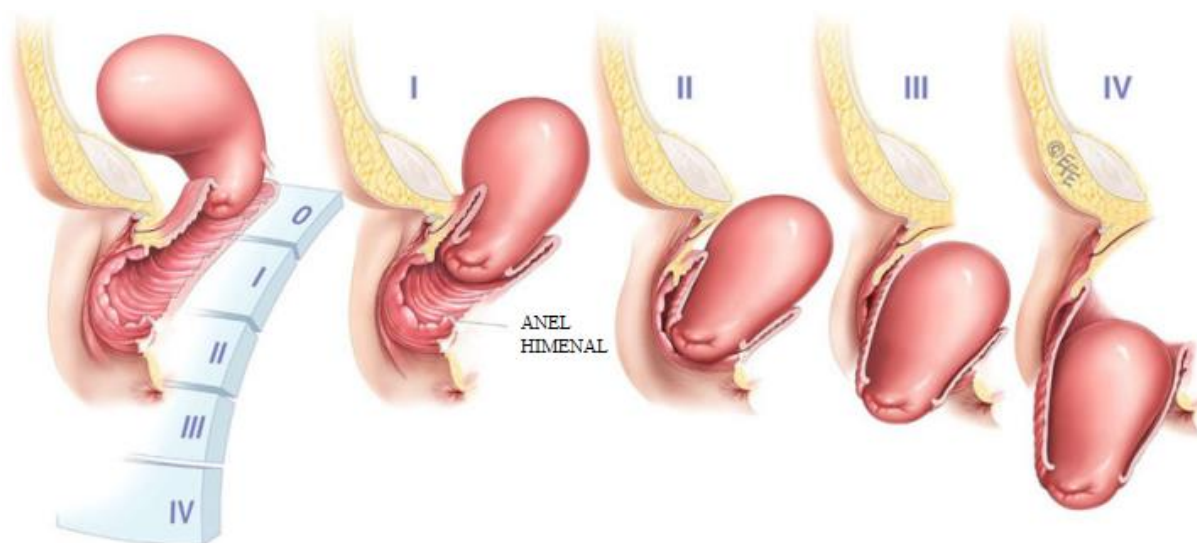


Figura 2 – Prolapso estadiamentos 0, I, II, III, e IV segundo POP-Q, sendo o colo uterino o ponto de maior prolapso. (Adaptada de Haylen et al.)³

1.4 Sustentação e suporte do assoalho pélvico

Os órgãos pélvicos femininos são suportados por músculos pélvicos, ligamentos e pelve óssea. Os espaços são preenchidos com tecido conjuntivo feito de uma rede de fibras de proteínas extracelulares resistentes incorporadas em um gel de polissacarídeo.⁽²²⁾

O assoalho pélvico consiste em músculo e em controle neural, mantidos em conjunto por tecido conjuntivo dispostos em um único arranjo tridimensional. Juntos, a estrutura única formada por esses três tipos de tecido influencia o suporte e a função do órgão pélvico. A capacidade de compreender a falha no tratamento e a estratégia de prevenção devem, portanto, surgir da compreensão desses três elementos de tecido e suas interações estruturais e funcionais.⁽⁹⁾

O músculo levantador do ânus corresponde ao componente muscular estriado, compreende a porção mais inferior e é formado pelos músculos pubococcígeo, iliococcígeo e coccígeo. A contração tônica do músculo levantador do ânus fornece apoio aos órgãos pélvicos, agindo como uma prateleira sobre a qual repousam terminações anatômicas para dar passagem à uretra, à vagina e ao reto.⁽¹⁵⁾

Apesar de uma contribuição bem conhecida dos músculos levantadores do ânus para o apoio do assoalho pélvico, estudo recente demonstrou que uma grande proporção de mulheres com prolapso não apresentou evidência de lesão muscular. Estudos anteriores também demonstraram anormalidades na histomorfologia e ultraestrutura dos tecidos conjuntivos de suporte vaginal em mulheres com prolapso. No entanto, a partir desses estudos, é impossível distinguir entre causas e efeitos do prolapso. Há poucos dados de estudos de tecido humano que avançaram nosso conhecimento sobre a patogênese do POP.⁽²⁶⁾

O suporte do tecido conjuntivo da vagina pode ser dividido conceitualmente em três níveis que correspondem a diferentes áreas de suporte (Figura 3). A porção da vagina adjacente ao colo do útero é suspensa de cima (nível I: suspensão) pelo longo tecido conectivo do paracolpo superior. Na parte média da vagina o paracolpo torna-se mais curto e liga a parede vaginal lateralmente às paredes pélvicas (nível II: anexo). Perto do introito, a vagina é fundida lateralmente aos músculos levantadores e posteriormente ao corpo perineal, enquanto anteriormente funde-se com a uretra (nível III: fusão).⁽³³⁾

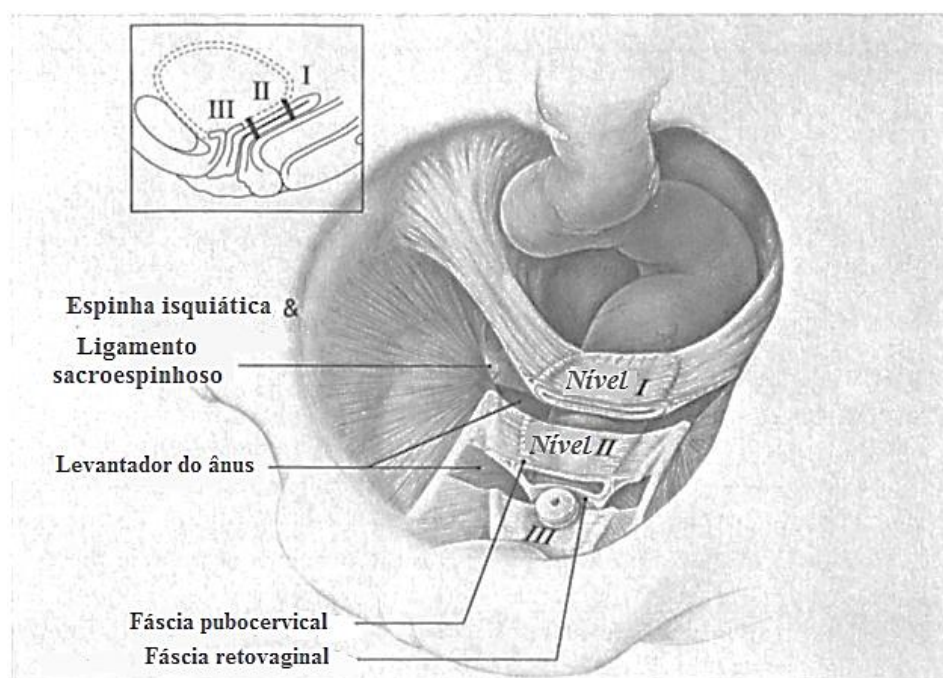


Figura 3 – No nível I, o paracolpo suspende a vagina a partir das paredes pélvicas laterais. Fibras do nível I estendem-se tanto verticalmente quanto também para trás em direção ao sacro. No nível II, a vagina é ligada ao arco tendíneo da fáscia pélvica e fáscia superior dos músculos levantadores do ânus. Fonte: adaptada de Delancey, 1992.

1.5 Tecido Conjuntivo

A parede vaginal é composta por quatro camadas: uma camada superficial de epitélio escamoso estratificado; uma camada de tecido conjuntivo denso subepitelial, composta principalmente por colágeno e elastina; uma camada de músculo liso denominada muscular; e adventícia, composta por tecido conjuntivo frouxo. Juntos, o subepitélio vaginal e musculatura formam uma camada fibromuscular embaixo do epitélio vaginal, proporcionando suporte longitudinal e central.⁽³³⁻³⁵⁾

O tecido conjuntivo de suporte é uma folha contínua e interdependente que sustenta a vagina e os órgãos pélvicos.⁽³⁴⁾ É uma estrutura altamente dinâmica que se adapta de maneira estrutural e funcional ao aumento da carga mecânica e desempenha função de preenchimento e conexão entre os órgãos e tecidos, atuando no transporte de substâncias e na defesa do organismo.^(33,36-40)

Ele é formado pela matriz extracelular (MEC), rede de fibras proteicas imersas em gel de polissacarídeos, e células diferenciadas como fibroblastos, fibrócitos, mastócitos e células adiposas, e uma quantidade significativa de músculo liso.^(15,41-43)

O tecido conjuntivo contém fibras colágenas e elásticas, e proteoglicanos e glicoproteínas que formam uma matriz viscoelástica. A relação entre fibras e sua matriz é importante para as propriedades físicas do tecido respectivo. Células que estão incorporadas na matriz extracelular compreendem 20% do volume do tecido conjuntivo. Os processos metabólicos que ocorrem dentro do tecido conjuntivo parecem desempenhar um papel importante na regulação das concentrações de colágeno na região periuretral.⁽⁴¹⁾

A associação entre POP e metabolismo do tecido conjuntivo está bem estabelecida, embora a causalidade desta associação não seja clara. As características do tecido conjuntivo do assoalho pélvico de pacientes com POP relacionam-se ao reparo tecidual. Para resolver a questão de causa e efeito, o papel dos fibroblastos na produção da matriz extracelular deve ser esclarecido.⁽³⁴⁾

1.6 Matriz extracelular

A matriz extracelular é essencial para proporcionar propriedades mecânicas e fisiológicas para vários tecidos, e também fornece locais de ligação para a ancoragem de células e suporte para sua migração nos tecidos.⁽⁴⁴⁾ Contém um grande número de diferentes proteínas colágenas e não colágenas que são distintas e possuem funções estruturais e biológicas definidas.⁽⁴⁵⁾

Os múltiplos componentes da matriz dividem-se em dois tipos: 1) moléculas proteicas alongadas que se unem formando estruturas fibrilares e são responsáveis pelo arcabouço estrutural e elástico, como colágeno e elastina; 2) estruturas não fibrilares que podem ter dois subtipos: a) glicoproteínas alongadas como a fibronectina e a laminina; b) glicosaminoglicanos e proteoglicanos, que formam gel hidrófilo, semifluido que permite a circulação de nutrientes, hormônios e outros mensageiros químicos.⁽⁴⁶⁾

A matriz extracelular sofre alterações progressivas durante a senescência que se caracterizam pela diminuição da solubilidade, diminuição da digestibilidade proteolítica, tempo aumentado de desnaturação ao calor e acúmulo de material amarelo e fluorescente. Essas mudanças afetam particularmente os tecidos ricos em colágeno e provavelmente resultam da formação de ligações cruzadas intermoleculares relacionadas à idade.⁽⁴⁷⁾

1.7 Colágeno

Os colágenos formam uma família multigênica com pelo menos 39 membros, cujos genes são conhecidos por serem dispersos ao longo de pelo menos 15 cromossomos. São as proteínas estruturais da matriz extracelular mais abundantes no corpo mamífero.⁽⁴⁴⁾

O colágeno é uma proteína fibrosa que proporciona grande parte da resistência à tração para pele, tendões e ossos.⁽⁴⁸⁾ Os colágenos fibrilares I, III e V,

presentes na vagina, e os tecidos de suporte são considerados os principais determinantes da força dos tecidos moles.⁽³⁴⁾ A composição de colágeno do tecido epitelial vaginal se parece muito à fáscia endopélvica.⁽⁴⁸⁾

Em 1954, Ramachandran e Kartha descobriram a estrutura tripla helicoidal do colágeno. No retículo endoplasmático são formadas cadeias α , seguidas de modificações de resíduos de prolina e lisina. Cada molécula de colágeno é feita de uma combinação precisa de três cadeias α -polipeptídicas. Dependendo do tipo de colágeno, as três cadeias de polipeptídeos α variam. As três hélices são torcidas juntas em uma hélice tripla, estabilizadas por inúmeras ligações de hidrogênio. Existe uma ligação cruzada covalente dentro das hélices triplas e uma quantidade variável de reticulação covalente entre as hélices de colágeno, resultando em colágeno que reside em tecidos de diferentes maturidades.⁽³⁴⁾

O colágeno de tipo I é frequentemente considerado como um colágeno de suporte e é encontrado em abundância em tecidos onde o suporte é necessário, como tendão, osso e dentina. O colágeno de Tipo III, por outro lado, é encontrado em tecidos onde é necessária menor rigidez, como o sistema vascular e o intestino.⁽⁴⁹⁾

O colágeno I copolimeriza com colágenos III e V para formar fibrilas com diâmetros controlados. Essas fibrilas influenciam as características biomecânicas de um dado tecido. Um aumento nos colágenos III e V diminui a resistência mecânica do tecido conjuntivo, diminuindo o tamanho da fibra. Em geral, concorda-se que uma proporção maior de I / III no ligamento é indicativa de maior resistência, enquanto que uma proporção mais baixa pode resultar em laxidade tecidual.⁽³⁴⁾

Os determinantes genéticos do POP são geralmente considerados como ligados a subtipos de colágeno ou metabolismo do tecido conjuntivo, embora não seja claro se as alterações observadas são a causa ou efeito do prolapso.⁽⁴⁾

Söderberg et al. encontraram menor concentração de colágeno na matriz extracelular do tecido conjuntivo endopélvico de mulheres mais jovens com prolapso genital em comparação com os controles. Acredita-se que isso é resultado

de uma remodelação de matriz extracelular alterada – produção diminuída ou degradação aumentada - devido a um fator constitucional, ao invés de idade.⁽⁵⁰⁾

O teor de colágeno do assoalho pélvico também é dependente de estrogênio. Na análise bioquímica do tecido do assoalho pélvico, demonstrou-se que há uma redução no teor total de colágeno quando as concentrações de estrogênio diminuem. Além disso, há uma redução no teor de colágeno no tecido genitourinário de mulheres com prolapso genital quando comparado com mulheres sem prolapso, independentemente dos estados da menopausa.⁽⁴⁾

1.8 Elastina

O principal componente das fibras elásticas é um polímero composto pela proteína elastina, conhecida como tropoelastina na sua forma monomérica. A polimerização requer um passo inicial de desaminação oxidativa de resíduos de lisina catalisadas por lisiloxidasas (LOX).⁽²⁷⁾

A elastina é uma proteína semelhante a uma borracha e muito estável, produzida por fibroblastos durante o desenvolvimento fetal e a infância. Forma fibras elásticas com microfibrilas associadas à elastina, o que permite o alongamento do tecido.⁽⁵⁰⁾

Colágeno e elastina são os dois principais componentes dos tecidos conjuntivos e de suporte da vagina, sendo o colágeno responsável pela resistência à tração e a elastina pela elasticidade e capacidade de recuo. A resistência à tração dos tecidos conjuntivos do assoalho pélvico é crucial para órgãos que são constantemente sujeitos a pressão intra-abdominal.^(22,51)

As fibras de elastina aparentemente desempenham um papel central no fornecimento de elasticidade e resiliência a alguns tecidos, como a pele, grandes artérias e certos ligamentos especializados.⁽⁵²⁾ Elas permitem que o tecido se estique e volte à sua forma original sem entrada de energia.⁽³⁴⁾

Nos seres humanos, os defeitos da elastina são responsáveis pela falha biomecânica específica do órgão no enfisema e no aneurisma da aorta. Da mesma forma, a deficiência de elastina pode desempenhar um papel no desenvolvimento de prolapso vaginal.⁽³⁰⁾

Os tecidos pélvicos femininos são ricos em fibras elásticas. Na maioria dos tecidos adultos elas se desenvolvem lentamente, mas sofrem remodelação maciça nos órgãos reprodutivos durante a gravidez e parto.⁽⁶⁾

As fibras elásticas maduras são extremamente estáveis, associadas a pouco turnover, e são essencialmente concebidas para durar a vida de um organismo. Por conseguinte, uma diminuição no teor de elastina do tecido prolapsado sugeriria uma anomalia que é importante na patogênese da doença, em vez de um efeito secundário da doença.⁽³⁰⁾

Em várias patologias, as fibras elásticas são danificadas ou degradadas e podem se solubilizar durante a progressão natural da doença. Exemplos de tais doenças incluem aneurismas aórticos, enfisema e síndrome de Marfan. Em outros casos, a formação inicial de fibras elásticas pode ser afetada. Isso ocorre principalmente nas doenças que foram associadas ao gene da elastina, como estenose aórtica supravalvar e cutis laxa. Após a destruição de fibras elásticas, as células elastogênicas são muitas vezes reativadas e começam a sintetizar pelo menos alguns dos componentes de fibras elásticas. Na maioria das situações, no entanto, as fibras elásticas produzidas em resposta à doença são aberrantes e podem até interromper ou prejudicar a função normal do tecido.⁽⁵³⁾

A gravidez é o único momento na vida de um adulto que ocorre turnover significativo de elastina, quando ocorre remodelação profunda do tecido conjuntivo. A paridade é um fator de risco para o prolapso. A gravidez é um período vulnerável na homeostase da fibra de elastina, pois há um tempo de remodelação extenso nessa fase, podendo ocorrer defeitos na sua síntese e mais tarde levar ao prolapso de órgãos pélvicos.⁽³⁰⁾

Avaliando os ligamentos cardinais, Yamamoto et al. relataram uma diminuição na expressão de mRNA e síntese de elastina em fibroblastos cultivados

de mulheres com POP.⁽⁵²⁾ Ewies et al. descobriram que a expressão de elastina era menor em ligamentos cardinais prolapsados.⁽⁵⁴⁾

Em análise de tecido de parede vaginal, Chen et al. encontraram diminuição de inibidores endógenos de elastases, com aumento da atividade elastolítica resultando em diminuição do teor de elastina no tecido periuretral de mulheres com disfunção do assoalho pélvico em comparação com controles assintomáticos.⁽⁵⁵⁾ Karam et al. encontraram que a expressão e largura de fibra de elastina foram significativamente menores na parede vaginal anterior de mulheres pós-menopáusicas com POP III e IV.⁽⁵⁶⁾

Goepel et al. descobriram diminuição do teor de elastina no ligamento uterossacro de mulheres pós-menopausa com POP.⁽⁵⁷⁾

1.9 Lisiloxidasas

As lisiloxidasas são oxidasas de monoamina dependentes de cobre secretadas por células fibrogênicas, incluindo fibroblastos e células de músculo liso. A elastogênese requer uma estrutura de andaime sobre a qual a elastina é depositada. Acredita-se que as microfibrilas, constituídas por fibrilinas e glicoproteínas associadas a microfibrilas, servem de andaime para guiar a deposição de elastina. A inativação de genes que codificam a fibrilina-1 e a fibrilina-2 individualmente indicam que cada uma pode ser dispensável para elastogênese. A proteína de ligação à elastina, a fibulina-5 e uma lisil-oxidase não especificada também foram associadas com fibras elásticas. Estudos de orientação gênica mostram que a fibulina-5 é necessária para desenvolvimento das fibras.⁽⁵⁸⁾

Os tecidos elásticos comprometidos mecanicamente, como os encontrados na síndrome de Menkes e o latirismo, estão associados à diminuição da atividade da LOX, demonstrando que a reticulação adequada é essencial para a função adequada de elastina.⁽²⁶⁾

Diferente da LOX prototípica, LOXL1 localiza-se especificamente em sítios de elastogênese e interage com a fibulina-5. Assim, a deposição de polímero de elastina é um aspecto crucial da manutenção de fibras elásticas e é dependente de LOXL1, que serve tanto como uma enzima de ligação quanto um elemento do andaime para garantir a deposição espacial de elastina.⁽⁵⁸⁾ Os aminoácidos reticulantes, desmosina e isodesmosina, formados através da ação de LOXL1, são exclusivos da elastina e têm sido usados como medida quantitativa do teor de elastina.⁽²⁷⁾

Um papel seletivo para LOXL1 na elastina, mas não no metabolismo do colágeno, é respaldado por medições de desmosina e hidroxiprolina, que representam ligações cruzadas de elastina e colágeno, respectivamente. Os níveis de desmosina foram significativamente menores em vários tecidos de camundongos *Loxl1* - / - do que em tecidos correspondentes de camundongos tipo selvagem, enquanto que os níveis de hidroxiprolina permaneceram inalterados.⁽⁵⁸⁾

Em estudos recentes em animais, ratas com deficiência de proteínas LOXL1 desenvolveram manifestações da disfunção do assoalho pélvico. Foi relatada a disfunção do trato urinário inferior de camundongos alterados geneticamente, provavelmente por disfunção uretral. Em outro estudo experimental, foi demonstrado que a deficiência de LOXL1 afeta negativamente as propriedades biomecânicas da vagina do rato e dos tecidos de suporte.^(26,42)

Liu et al. demonstraram que os ratos deficientes em LOXL1 eram viáveis. As fêmeas eram inicialmente férteis, mas sofreram prolapso pélvico 1-2 dias após o parto. Tecidos prolapsados retraíram ao longo do tempo, mas proeminente descida pélvica permaneceu, indicando danos permanentes ao assoalho pélvico. Ratos LOXL1 - / - de ambos os sexos desenvolveram espaços aéreos ampliados do pulmão, aumento da frouxidão e redundância da pele, prolapso retal e divertículos intestinais.⁽⁵⁸⁾

Alperin et al. evidenciaram que o desenvolvimento do prolapso do órgão pélvico correlaciona-se ao comportamento biomecânico alterado do complexo do tecido conjuntivo de suporte vaginal em camundongos deficientes em LOXL1, independentemente do parto. A análise de camundongos mutantes e selvagens

pareados por idade revelou o papel da elastina na patogênese do prolapso de órgãos pélvicos independente do envelhecimento.⁽²⁶⁾

Os dados sobre a expressão de LOXL-1 em tecidos humanos são escassos. Lemmela et al. analisaram o SNP rs2165241, uma alteração C-T no intron 1 do gene LOXL1, bem como dois outros SNPs LOXL1, rs1048661 (153456.0001) e rs3825942 (153456.0002), em um estudo de caso-controle de 59 pacientes finlandeses com síndrome de esfoliação (XFS) e 82 com glaucoma de esfoliação (XFG) e um estudo familiar de 28 pacientes com XFS ou XFG e 92 parentes não afetados de uma família finlandesa extensa. Eles encontraram associação significativa em ambos os estudos com o alelo de risco (T) de rs2165241. O correspondente haplótipo de 3-locus GGT aumentou o risco de XFS / XFG quase 15 vezes em relação ao haplótipo de GAC de baixo risco ($p = 1,6 \times 10^{-16}$).⁽⁵⁹⁾

Kobak et al. descobriram que a expressão de RNAm de LOX foi significativamente reduzida em pacientes com prolapso grave de órgão pélvico. Wieslander et al. encontraram que a expressão de mRNA de LOXL-1 diminuiu em mulheres pré-menopáusicas com prolapso, mas aumentou em mulheres pós-menopáusicas com prolapso. Estudos prospectivos são necessários para determinar se estas alterações na MEC causam o desenvolvimento de POP ou são resultado de cargas mecânicas alteradas no tecido prolapsado.⁽⁵¹⁾

Klutke et al. demonstraram uma redução quádrupla na LOXL1 nos ligamentos uterossacros das mulheres com POP.⁽³⁰⁾ May Alarab et al encontraram expressão de genes LOX, LOXL1 e LOXL3, bem como proteínas LOX e LOXL3 significativamente reduzidas em mulheres na fase proliferativa do ciclo menstrual com POP avançado ($P < 0,05$).⁽²²⁾ Estes dados demonstram a importância das fibras elásticas na manutenção da integridade estrutural e funcional do assoalho pélvico feminino, e aumentam a possibilidade de que falhas na manutenção da homeostase de fibras elásticas envolvendo as proteínas da família LOX estejam subjacentes às disfunções do assoalho pélvico na mulher.⁽³¹⁾

1.10 Polimorfismo de nucleotídeo único

Os polimorfismos de nucleotídeo único (SNPs) são posições de pares de bases simples em DNA genômico em que existem diferentes alternativas de sequência (alelos) em indivíduos normais em algumas populações, onde o alelo menos frequente tem uma frequência de 1% ou superior (Figura 4).⁽⁶⁰⁾

Houve um crescente reconhecimento de que grandes coleções de SNPs mapeados fornecem uma ferramenta importante para estudos genéticos humanos. Considerados o tipo mais comum de variação genética humana, os SNPs podem servir como marcadores genéticos para identificar genes de doenças por estudos de ligação em famílias, desequilíbrio de ligação em populações isoladas e análise de associação de pacientes e controles.⁽⁶¹⁾

Os SNPs que não modificam os aminoácidos codificados são chamados de sinônimos e não estão sujeitos à seleção natural. Por outro lado, os SNPs não-sinônimos alteram aminoácidos e podem ser sujeitos à seleção natural. Os SNPs observados em indivíduos de uma população podem influenciar a atividade promotora ou a conformação do DNA e do pré-RNA, desempenhando um papel direto ou indireto na expressão fenotípica.⁽⁶²⁾

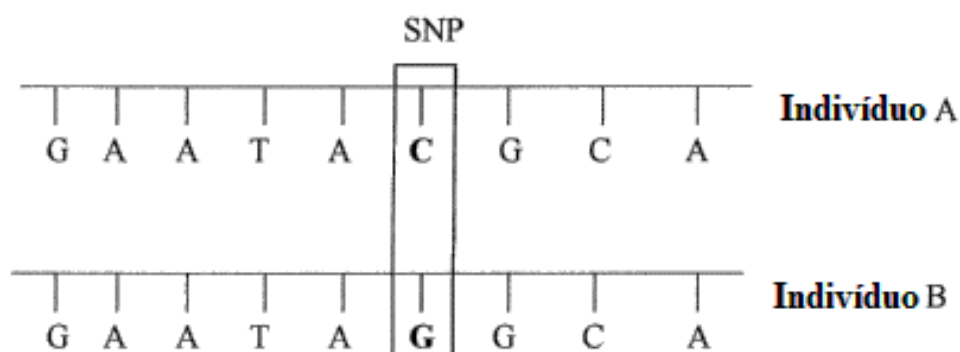


Figura 4 – Os polimorfismos de um único nucleotídeo (SNPs) são variações de base única entre diferentes pessoas. A figura mostra as cordas de nucleotídeos nas quais indivíduos A e B diferem apenas por uma base. Fonte: adaptada de Shastry, 2002.

1.11 Genética e prolapso de órgãos pélvicos

A fisiopatologia do POP é multifatorial com fatores de risco que podem ser categorizados como predisponentes, incitantes, promotores e que causam descompensação. Dependendo da combinação desses fatores de risco em um indivíduo, o prolapso pode ou não se desenvolver ao longo da vida. No momento, o impacto potencial de fatores genéticos não foi esclarecido.⁽⁶⁾

Jack et al. investigaram a transmissão familiar do prolapso genital em uma coorte de 10 pacientes com prolapso dos estádios III e IV. Os autores descobriram um risco cinco vezes maior de defeitos severos do assoalho pélvico nas mães, irmãs e avós dos pacientes no grupo de estudo, demonstrando que, dentro dessas famílias, a transmissão da doença seguiu um padrão de herança dominante com alta penetrância.⁽⁶³⁾

Altman et al. encontraram aumento das taxas de concordância e maiores correlações de suscetibilidade em gêmeos monozigóticos comparados com gêmeos dizigóticos, sugerindo a influência de um componente genético na etiologia da doença do assoalho pélvico.⁽⁷⁾

A síndrome de Ehlers-Danlos representa um grupo heterogêneo de distúrbios do tecido conjuntivo composto por ≥ 10 subtipos que envolvem defeitos genéticos de colágeno. Sua prevalência foi estimada em 1:5000. Os achados clínicos incluem: hiperdistensibilidade da pele, hipermobilidade das articulações, fragilidade anormal do tecido e contusões fáceis. As potenciais complicações ginecológicas e urológicas compreendem endometriose, dispareunia, incontinência, prolapso do órgão pélvico e divertículo da bexiga.⁽⁶⁴⁾

A síndrome de Marfan (MFS) é um distúrbio hereditário autossômico dominante do tecido conjuntivo em que o envolvimento dos sistemas cardiovascular, esquelético, ocular e outros podem estar presentes. A MFS é causada por uma mutação no gene para MFS (FBN1) no cromossomo 15q21 que codifica a proteína da matriz extracelular chamada fibrilina-1.⁽⁶⁵⁾

Vários estudos em animais sugerem o papel do defeito genético do gene LOXL1 na fisiopatologia da incontinência urinária de esforço (IUE). Na fisiopatologia de muitos estudos clínicos, o SNP no gene LOXL1 foi implicado. Os SNPs mais comumente estudados de LOXL1 são rs1048661, rs3825942 e rs2165241.⁽²⁷⁾

Um modelo de ratos com deficiência de LOX1, aproximadamente um terço dos camundongos mutantes femininos desenvolveram POP grave após a primeira ninhada, e todos os dois terços restantes desenvolveram prolapso após a segunda ninhada, destacando o papel essencial para a homeostase de fibras elásticas no assoalho pélvico e remodelação pós-parto.^(30,58)

A substituição de uma guanina por uma timina (G/T) no local de ligação do fator de transcrição Sp1 do Col1A1 leva à produção anormal da cadeia α -1 do colágeno em comparação com a cadeia α -2, o que levanta a possibilidade de que alguns colágenos podem estar presentes na forma de homotrímeros em vez dos heterotrímeros habituais. Este polimorfismo foi investigado em estudos poloneses e brasileiros, porém não foi observada associação com POP.^(66,67)

Skorupski et al. investigaram as associações entre o SNP tipo 1G / 2G na posição -1607 / -1608 do gene da metaloproteinase da matriz (MMP) -1 e SNP tipo 5A / 6A na posição -1612 / -1617 do gene MMP-3 e desenvolvimento do prolapso de órgãos pélvicos em mulheres. Os autores encontraram que, quando estimado individualmente, nenhum dos SNPs investigados estava associado ao POP. A análise combinada de SNP de MMP-1 / MMP-3 mostrou que os seguintes pares polimórficos estavam sobre representados em mulheres com POP: 1G / 2G -5A / 6A, 2G / 2G -5A / 6A, 2G / 2G -5A / 5A, 1G / 1G-6A / 6A.⁽⁶⁸⁾

Ferrell et al., em um estudo caso-controle envolvendo mulheres caucasianas e afro-americanas, investigaram a presença do SNP 45008784A>C na região promotora do gene da LOXL-1 em 137 pacientes com POP e 141 controles. Não foi observada associação entre o polimorfismo e o fenótipo POP, assim como nenhuma frequência alélica foi significativamente associada à etnia.⁽⁶⁾

Ozbek et al. encontraram polimorfismo homozigoto CC mais elevado do que no controle na região rs3825942 do gene LOXL-1 em pacientes com IUE,

porém sem diferença estatisticamente significativa entre os grupos. Nas regiões rs2165241 e rs1048661 do gene LOXL1, os polimorfismos homozigotos TT foram significativamente elevados em comparação com o grupo controle.⁽²⁷⁾

Neupane et al. analisaram a sequência de codificação LOXL1 humana para SNPs em pacientes com POP em comparação com mulheres assintomáticas. Das 6 variações de sequências identificadas no LOXL1, nenhuma delas mostrou diferenças significativas na frequência entre os grupos de casos e controles. Porém, há a possibilidade que o tamanho da população de estudo pode não ter sido suficientemente grande para detectar uma diferença significativa entre pacientes com POP e controles.⁽⁶⁹⁾

Um estudo de mulheres com prolapso estadio III ou maior apresentou supressão da LOXL-1 em ligamentos uterossacos.⁽³⁰⁾ O gene que codifica esta enzima representa um locus potencial onde a variação genética pode predispor as mulheres ao desenvolvimento de POP.⁽⁶⁾

Interessou-nos estudar a presença ou não de polimorfismo genético relacionado ao gene que codifica a LOXL-1 em pacientes com POP, para verificar a sua possível associação com essa patologia na população brasileira.

2 OBJETIVOS

- Verificar a frequência do polimorfismo rs2165241 do gene da LOXL-1 em pacientes com POP acentuado e em mulheres sem POP.
 - Verificar a potencial associação entre a presença do polimorfismo rs2165241 do gene da LOXL-1 com POP.
 - Verificar quais variáveis demográficas podem ser consideradas fatores de risco individuais para POP.
-

3 MATERIAL E MÉTODOS

Este é um estudo de caso-controle, desenvolvido no Setor de Uroginecologia, pertencente à Disciplina de Ginecologia Geral, Departamento de Ginecologia da Universidade Federal de São Paulo – Escola Paulista de Medicina. O projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da UNIFESP (CEP nº 0959.0075.08/2018) e incluído na Plataforma Brasil (CAAE 96200518.3.0000.5505).

3.1 Recrutamento de pacientes

Foram recrutadas e incluídas 630 pacientes atendidas nos ambulatórios de Uroginecologia e do Climatério desta instituição.

As pacientes pertenciam a dois grupos: grupo caso, apresentando POP estádios III ou IV pelo POP-Q, e grupo controle, composto por mulheres sem POP ou com mínimo descenso das paredes vaginais (estádios 0 ou I pelo POP-Q).

Foram incluídas apenas mulheres adultas na pós-menopausa. Não incluímos mulheres com doença maligna do trato genitourinário, que tivessem sido submetidas a radiação pélvica prévia, pacientes no menacme ou as que não permitiram a coleta sanguínea. Não incluímos as mulheres que se submeteram a cirurgias pélvicas prévias, tais como histerectomia (total ou subtotal) ou correção de POP, em ambos grupos.

No ambulatório, as pacientes eram submetidas a anamnese e exame físico geral e ginecológico completos, incluindo mensuração de descenso dos órgãos pélvicos pela classificação de POP-Q, conforme padronizado pela Sociedade Internacional de Continência.⁽³⁾ As candidatas ao estudo eram então convidadas a participar do mesmo. Procedia-se a leitura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) e esclarecimento de quaisquer dúvidas remanescentes, e as mulheres que aceitavam a participação assinavam e recebiam uma cópia do TCLE. Procedia-se, então, a coleta de 10ml de sangue, em tubos com anticoagulante EDTA, de veia periférica de membro superior.

Após a coleta, o sangue era levado imediatamente ao laboratório de Biologia Molecular da Ginecologia para processamento.

3.2 Extração de DNA Genômico

O sangue coletado era centrifugado a 10000 rotações por minuto (rpm) durante 10 minutos para que fosse retirada a fase leucocitária, com posterior congelamento desta (Figura 5).

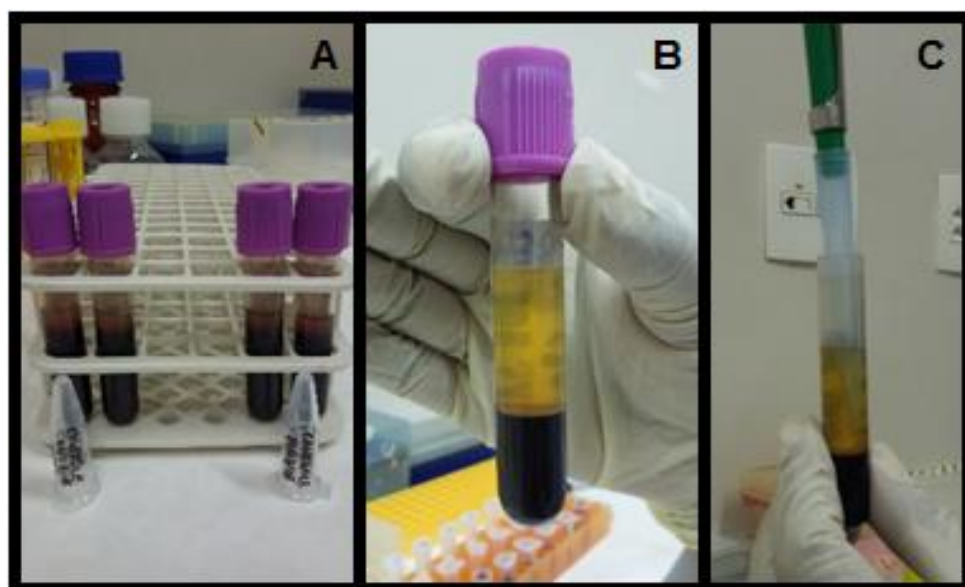


Figura 5 – A - Sangue coletado / B - Alo leucocitário aparente após centrifugação / C - Retirada da fase leucocitária.

A extração do DNA genômico foi realizada segundo protocolo do kit comercial *Illustra™ blood genomicPrep Mini Spin Kit* (GE Healthcare, Buckinghamshire, UK): Tubos tipo eppendorf de 1,5ml eram enumerados segundo a sequência das pacientes. 20µl de solução de proteinase K eram adicionados em cada um desses tubos, seguida da adição de 450µl de fase leucocitária (previamente separada do sangue total) e de 400µl de solução de tampão de lise

(*lysis buffer type 10*). Esses tubos eram colocados no aparelho vórtex para homogeneizar o conteúdo por 15 segundos cada tubo, sendo o processo repetido após 10 minutos. Então, o conteúdo homogeneizado de cada tubo era transferido para colunas de purificação (acopladas a tubos coletores limpos). Procedia-se a primeira centrifugação, a 13000 rpm por 3 minutos, após a qual o material do tubo coletor era desprezado. Adicionava-se à coluna mais 500µl de solução de tampão de lise (*lysis buffer type 10*) e procedia-se nova centrifugação a 13000 rpm por três minutos. Desprezava-se o material do tubo coletor e adicionava-se 500µl de tampão de lavagem (*wash buffer type 6*). Era realizada a terceira centrifugação a 13000 rpm por 3 minutos e desprezava-se material do tubo coletor. Após, a coluna era transferida para um tubo eppendorf de 1,5ml limpo, devidamente identificado com as iniciais da paciente e data de extração do DNA. Adicionava-se ao centro da coluna 25µl de água *RNAse free* aquecida a 70°C, devendo-se aguardar 1 minuto e procedendo-se centrifugação a 13000 rpm por 2 minutos. Realizava-se nova adição de 25µl de água *RNAse free* aquecida a 70°C à coluna e realizava-se a centrifugação final, a 13000 rpm por 2 minutos. Por fim, a coluna era desprezada e fechava-se os tubos contendo DNA purificado, levando-os para armazenamento à temperatura de -20°C (Figura 6).

No dia seguinte à extração, era feita quantificação e avaliação de pureza do DNA extraído por espectrofotometria através do aparelho Nanodrop 2000 (Thermo Scientific, Waltham, USA), que necessita da utilização de 1µl de material extraído, fazendo a leitura através de um software específico (Nanodrop 2000 Software, Waltham, USA). Para que a amostra fosse considerada adequada à utilização, precisava apresentar quantidade de DNA maior que 2ng/µl e relação de pureza 260/280 entre 1,40 e 2,20 (Figura 7).

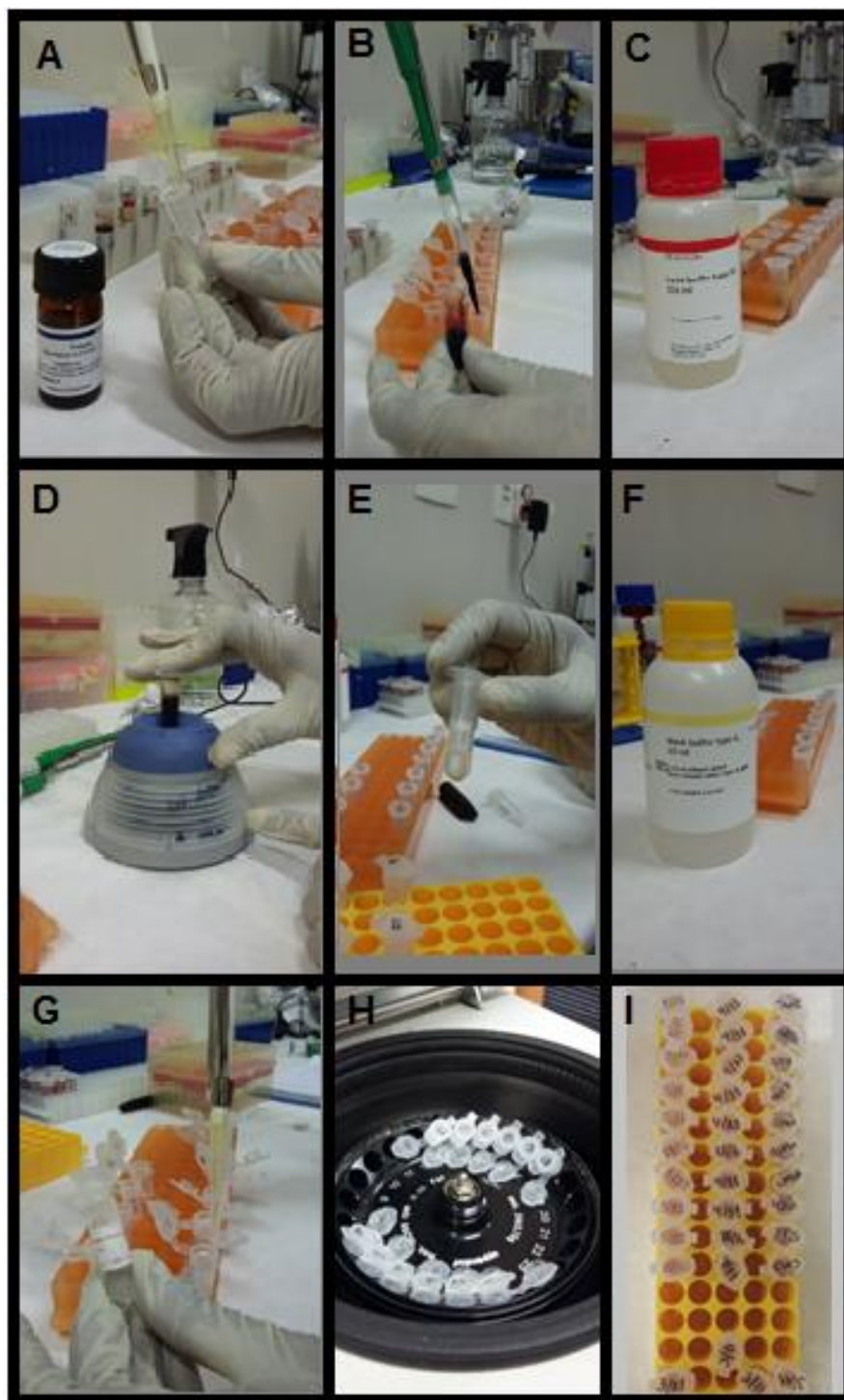


Figura 6 – Sequência de extração de DNA a partir da fase leucocitária, segundo protocolo do kit GE®: A - Colocação de proteinase K / B - Colocação da fase leucocitária / C - Acréscimo da solução de lise / D - Homogenização no vórtex / E - Eliminação de material coletado após centrifugação / F - Colocação de solução de lavagem / G - Adição de água *RNAse free* / H - Centrifugação final / I - DNA nos tubos finais identificados.

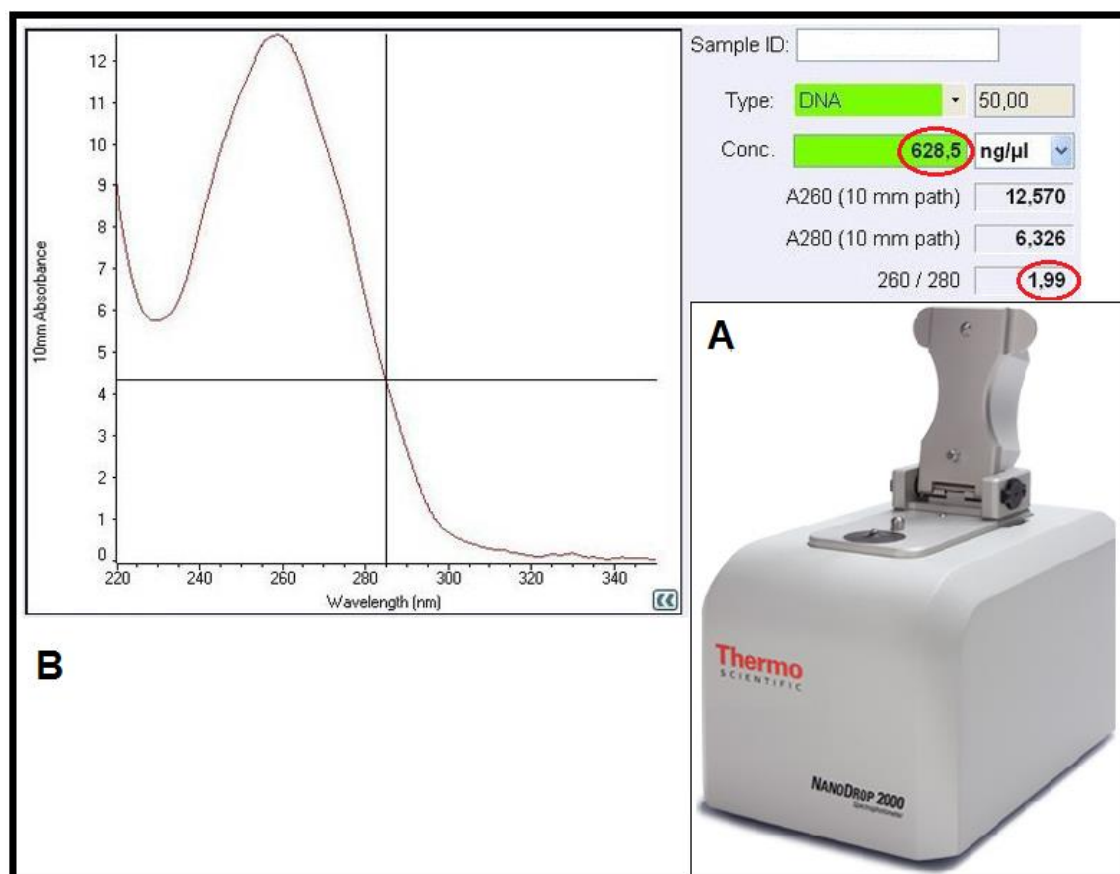


Figura 7 – A – Aparelho Nanodrop 2000, que fica conectado ao computador através de software específico / B – Gráfico do software após leitura da amostra, mostrando concentração de DNA e sua relação de pureza.

3.3 Análise de Polimorfismos por Real-Time PCR

O polimorfismo escolhido para análise, de acordo com dados da literatura, foi o rs2165241 do gene da LOXL-1. A genotipagem das amostras foi realizada em duplicata, por meio de reações em cadeia de polimerase em tempo real (RT-PCR) no equipamento *Step One Plus Real Time PCR System* (Applied Biosystems, Foster City, CA).

A montagem das placas de PCR era baseada em um mapa feito manualmente, com as amostras colocadas nas posições definidas para pipetagem do material e com duas colunas correspondentes a controles negativos, onde, em

vez de DNA, era adicionado 2µl de água *RNAse free*. Foi calculado um volume total de reação de 20µl por poço, com *Taqman® Universal PCR Master Mix II* (Applied Biosystem, Foster City, CA): 10µl de solução *TaqMan® Universal Master Mix II*, 1µl de solução de ensaio contendo o polimorfismo a ser estudado (obtido comercialmente), 7µl de água *RNAse free* e 2µl de DNA extraído. Após, as informações contidas no mapa eram digitadas no desenho da placa presente no software no aparelho de RT-PCR (Figura 8). Utilizamos 50 ciclos de amplificação em nossas reações de PCR.



Figura 8 – Montagem da placa para reação de RT-PCR: A – Pipetagem dos reagentes, exceto DNA / B – Mapa feito manualmente para definição dos poços para cada amostra de DNA / C – Pipetagem do DNA das amostras selecionadas / D – Montagem do desenho da placa no software do aparelho de RT-PCR.

Três genótipos eram possíveis. O alelo selvagem da LOXL-1 é representado pela letra C e o alelo polimórfico pela letra T. Desta forma, os genótipos possíveis são CC (homozigoto selvagem), CT (heterozigoto) e TT (homozigoto com polimorfismo variante).

Após o término da reação de RT-PCR, os resultados eram colocados em um gráfico do software *Step One Plus Real Time PCR System* (Figura 9) e, então, exportados para um arquivo do tipo eds (Excel).

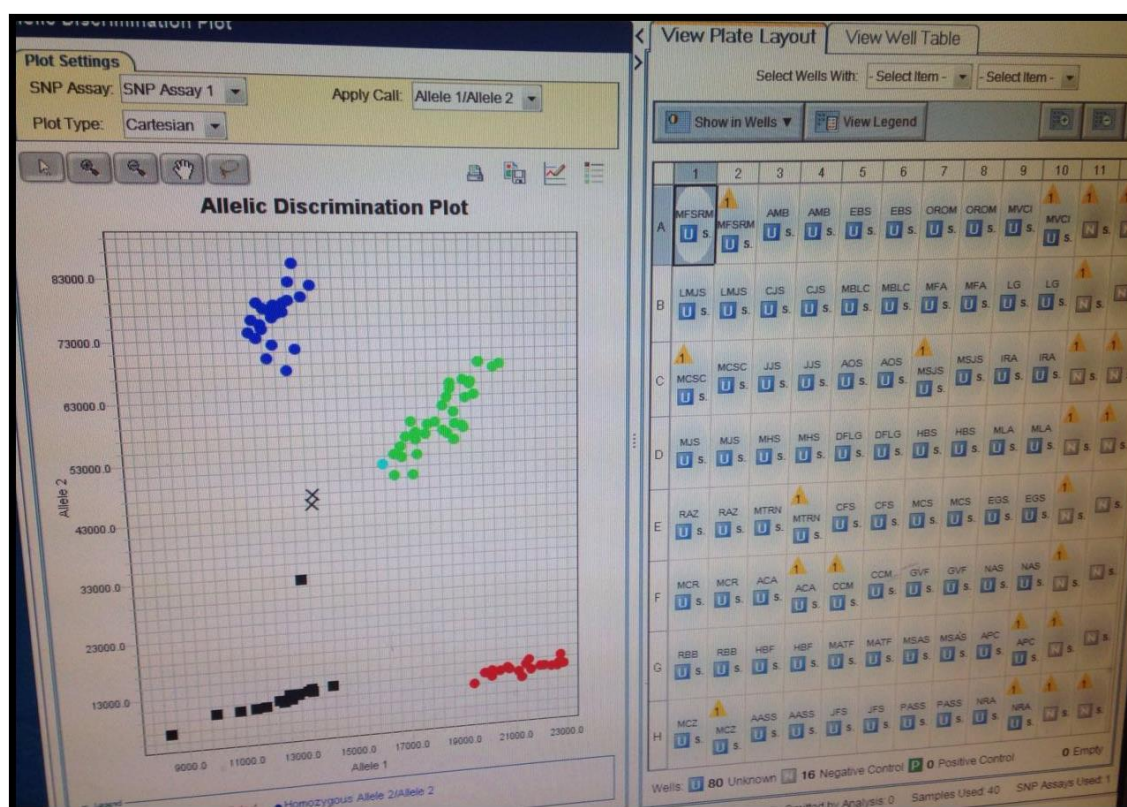


Figura 9 – Gráfico de análise de resultados do RT-PCR pelo *programa Step One Plus Real Time PCR System*: à esquerda, os pontos azuis correspondem aos indivíduos homozigotos sem mutação, os verdes aos heterozigotos e os vermelhos aos homozigotos com mutação; os pontos pretos correspondem aos controles negativos.

3.4 Análise Estatística

A análise estatística dos dados foi realizada no programa Statistical Package for Social Sciences (SPSS) versão 22.0. As variáveis categóricas foram descritas através de frequências simples e proporções e comparadas usando o teste de Qui-quadrado ou, se necessário, o teste Exato de Fisher ou da Razão de verossimilhança.

A normalidade das variáveis contínuas foi avaliada através do teste de Kolmogorov-Smirnov. As variáveis com distribuição normal foram descritas através de média e desvio-padrão e as variáveis com distribuição não-normal foram descritas através de mediana e valores mínimo e máximo. As comparações entre os grupos em relação às variáveis quantitativas foram realizadas através do teste paramétrico t-Student ou, quando necessário, através do teste não paramétrico de Mann-Whitney.

O Equilíbrio de Hardy-Weinberg foi calculado através do teste de Qui-quadrado, com um nível de significância de 5%.

A associação entre ser portador de polimorfismo para o genótipo LOXL-1 foi estimada em *odds ratio* (OR) e respectivos intervalos de confiança a 95% (IC 95%), usando modelo de regressão logística binária.

Para verificar se as variáveis com diferença entre os grupos podem ser consideradas fatores de risco independentes para o desenvolvimento da doença, foram calculados *odds ratio* (OR) e respectivos intervalos de confiança a 95% (IC 95%), usando modelos de regressão logística binária.

O nível de significância adotado foi de 5% ($p\text{-valor} \leq 0,05$).

3.5 Artigo enviado para publicação

LOXL-1 polymorphism in Brazilian women with and without pelvic organ prolapse

Abstract

Introduction and hypothesis We verified the presence of single nucleotide polymorphisms (SNP) rs2165241 of the lysyl oxidase-like 1 (LOXL-1) gene and the association with pelvic organ prolapse (POP) in Brazilian women and determined risk factors for POP development. **Methods** We assessed 630 postmenopausal women divided into POP (stages III and IV) and control (stages 0 and I) groups by examination and peripheral blood sample collection. DNA sequence of interest was analyzed by real-time reverse-transcriptase polymerase chain reaction (RT-PCR). We used logistic regression models for the analysis, with $p < 0.05$ for significance. **Results** There were no association between the polymorphism analyzed and POP. Multiple logistic regression analysis identified age [odds ratio (OR) = 1.09, confidence interval (CI) 95% = 1.07; 1.12], number of vaginal births (OR = 2.17, CI 95% = 1.67; 2.82), and family history (OR = 2.27, CI 95% = 1.41; 3.66) as independent risk factors for POP. Cesarean section was shown to be a protective factor (OR = 0.73, CI 95% = 0.56; 0.95). **Conclusion** Our research suggests that there is a lack of association between DNA polymorphism rs2165241 of LOXL-1 with advanced POP in this population.

Keywords Pelvic organ prolapse. Polymorphism. Collagen. Lysyl oxidase. Extracellularmatrix.

Introduction

Pelvic organ prolapse (POP), urinary incontinence (UI), and other sensory and emptying abnormalities of the lower urinary tract constitute a group of conditions called pelvic floor disorders.¹ These common conditions have been shown to affect approximately 27–50% of women aged 40 years and older.²

The descent of one or more of the anterior vaginal wall, posterior vaginal wall, the uterus (cervix) or the apex of the vagina (vaginal vault or cuff scar after hysterectomy) is defined as pelvic organ prolapse. The symptomatology includes sensation of pelvic pressure, vaginal bulging, bleeding and low backache and usually occurs when the structures reach or surpass the hymenal ring.³

It is estimated that 50% of parous women have some degree of genital prolapse, but only 10% to 20% seek evaluation and treatment for their condition.⁴ Based on pelvic examination, the prevalence of pelvic organ prolapse varies between 30% and 40%. Epidemiological studies suggest that 6% to 8% of women report a sensation of a mass bulging into the vagina⁵ and 3–6% have pelvic organ prolapse that descends beyond the vaginal opening on routine pelvic examination.²

Because the prevalence of POP increases with age, an increasing number of women are expected to be affected due to demographic change in the world population. Pelvic floor disorders can have a significant negative impact on quality of life, although they are not life-threatening medical conditions.^{6,7}

The etiology of POP is not clearly defined. Several factors seem to be associated with its onset, such as vaginal delivery, hypoestrogenism, fetal macrosomia, forceps and vacuum extractor use, hysterectomy and previous surgeries to correct genital dystopia.^{8,9,10}

It is notable that not all women who undergo vaginal delivery have severe POP, and that severe POP and urinary incontinence are described in nulliparous women.¹¹ One of the reasons for these conflicting results may be the fact that not all women are equally susceptible to prolapse.¹²

While women with few or no risk factors may develop POPs, sometimes even at an early age, some women with multiple risk factors never develop it.¹² It is likely that the multifactorial dysfunction is attributable to the combination of factors, and varies from patient to patient.¹³ Recent data suggest that genetic predisposition may contribute to this condition.¹⁴

Lince SL et al., in a meta-analysis, found a substantially increased risk of POP in case of a positive family history. Of the 16 studies included, only two studies did not find a statistically significant difference in the prevalence of positive family history among women with POPs and women without this condition.¹²

Miedel et al. found that, in addition to age and parity, overweight, history of conditions suggestive of deficient connective tissue (varicose veins/hernia/hemorrhoids), family history of prolapse, heavy lifting at work, and presence of constipation, hard stools, or difficult evacuation all were linked independently, significantly, and positively to the presence of symptomatic prolapse.¹⁵

Buchsbaum et al. found that the high concordance of pelvic organ prolapse in nulliparous and parous sister pairs suggests a familial predisposition toward developing this condition. However, vaginal delivery does appear to confer a risk for more advanced pelvic organ prolapse.¹⁶

The cause of pelvic floor dysfunction at the molecular level is unknown. Preventive strategies are not widely practiced and surgery remains a common therapy, in use for more than 100 years.¹⁷

As well as the identification of potentially modifiable environmental risk factors, knowledge of genetic susceptibility may provide insight into the pathogenesis of POP and promote the prevention and intervention of this condition.^{7,18}

The association between POP and connective tissue metabolism is well established, even though the causality of this association is unclear. The characteristics of the pelvic floor connective tissue of POP patients relate to tissue repair.¹⁹

Collagen and elastin are the two major components of tissues connective and supporting structures of the vagina. Collagen is responsible for tensile strength and elastin for elasticity and resilience. The tensile strength of the connective tissues of the pelvic floor is crucial for organs that are constantly subjected to intra-abdominal pressure.^{11,20}

Female pelvic tissues are rich in elastic fibers. In most adult tissues they turn over slowly but undergo massive remodeling in the reproductive organs through pregnancy and birth.⁶

Evaluating cardinal ligaments, Yamamoto et al. found that elastin mRNA steady-state levels and elastin synthesis were significantly down-regulated in quiescent fibroblasts from prolapsed uteri patients compared with quiescent control fibroblasts.²¹ Ewies et al. found that elastin expression was lower in prolapsed cardinal ligaments.²²

In vaginal wall tissue analysis, Chen et al. found a decrease in endogenous elastase inhibitors, with an increase in elastolytic activity resulting in decreased elastin content in the periurethral tissue of women with pelvic floor dysfunction compared to asymptomatic

controls.²³ Karam et al. found that elastin fiber expression and width were significantly lower in the anterior vaginal wall of postmenopausal women with POP III and IV.²⁴

Goepel et al. found decreased elastin content in the uterosacral ligament of postmenopausal women with POP.²⁵

Five related genes coding for the prototypic LOX and four LOX-like proteins (LOXL1, LOXL2, LOXL3, and LOXL4) have been defined. Lysyl oxidases (LOX) play a critical role in the formation and repair of the extracellular matrix (ECM) by oxidizing lysine residues in elastin and collagen, thereby initiating the formation of covalent crosslinkages, which stabilize these fibrous proteins.²⁶ LOXL1 is notable because it appears to be specific to the metabolism of elastin.¹⁷

Data on the expression of LOXL-1 in human tissues are scarce. Lemmela et al. analyzed rs1048661 as well as 2 other LOXL1 SNPS, rs3825942 and rs2165241(153456.0003), in a case-control study of 59 Finnish patients with exfoliation syndrome (XFS) and 82 with exfoliation glaucoma (XFG) and a family study of 28 patients with XFS or XFG and 92 unaffected relatives from an extended Finnish family. They found significant association in both studies with the risk (G) allele of rs1048661 ($p = 2.65 \times 10^{-5}$ and 0.0007, respectively). The corresponding 3-locus haplotype GGT increased the risk of XFS/XFG nearly 15-fold relative to the low-risk GAC haplotype ($p = 1.6 \times 10^{-16}$).²⁷

Kobak et al. have found that the mRNA expression of LOX was significantly reduced in patients with severe pelvic organ prolapse. Wieslander et al. reported LOXL-1 mRNA expression decreased in premenopausal women with prolapse, but was upregulated in postmenopausal women with prolapse. To determine whether these changes in ECM cause the development of POP or are seen as a result of altered mechanical loads on the prolapsed tissue, prospective studies are necessary.²⁰

In animal studies, mice with LOXL-1 protein deficiency have developed manifestations of pelvic floor dysfunction. The lower urinary tract dysfunction of mice, probably due to urethral dysfunction, has been reported. In another experimental study, LOXL-1 deficiency has been shown to negatively affect the biomechanical properties of the vagina and supporting tissues.^{14,28}

Liu et al. demonstrated that LOXL1-deficient mice were viable. Females were initially fertile but underwent pelvic prolapse 1–2 days postpartum. Prolapsed tissues retracted over time but prominent pelvic descent remained, indicating permanent damage to the pelvic floor. Inspection of pelvic organs found the uterine cervix stretched to several times the normal size, consistent with a loss of resiliency. *Loxl1*^{-/-} mice of both genders developed enlarged airspaces of the lung, increased laxity and redundancy of the skin, rectal prolapse and intestinal diverticula.²⁹

Alperin et al. have shown that the development of pelvic organ prolapse correlates with the altered biomechanical behavior of the vaginal support connective tissue complex in LOXL1-deficient mice, regardless of delivery. Analysis of mutant mice and age-matched wild-type mice revealed the role of elastin in the pathogenesis of pelvic organ prolapse independent of aging.¹⁴

Klutke J et al. demonstrated a quintuple reduction in LOXL1 in the uterosacral ligaments of women with POP.¹⁷ May Alarab et al found expression of LOX, LOXL1 and LOXL3 genes, as well as significantly reduced LOX and LOXL3 proteins in women in the proliferative phase of the menstrual cycle with advanced POP ($P < 0.05$).¹¹ These data demonstrate the importance of elastic fibers in maintaining the structural and functional integrity of the

female pelvic floor, and increase the possibility that failure to maintain elastic fiber homeostasis involving LOX family proteins underlies pelvic floor dysfunction in women.¹⁸ We developed this study to test the hypothesis that rs2165241 LOXL-1 polymorphism may be associated with POP in the Brazilian population due the importance of LOX enzymes in pelvic floor support and findings of previous genetic investigations.

Methods

The local Research and Ethics Board of the Federal University of São Paulo approved this case-control study (CEP: 0959.0075.08/2018).

Study population and assessment

Women who attended the General Gynecology Clinic and the Urogynecologic Clinic at Federal University of São Paulo, Brazil, were assessed for eligibility. The patients underwent an interview, clinical examination, gynecological evaluation, and Pelvic Organ Prolapse Quantification (POP-Q) system assessment.³

Candidate women were invited to contribute to the study, and an informed consent form was subsequently signed by participants. Two groups were formed: the case group consisted of postmenopausal women with stage III or IV POP, while the control group consisted of postmenopausal women with stage 0 or I who had never undergone prior pelvic surgery.

Demographic and clinical data were then obtained: age, body mass index (BMI), obstetric history, age at menopause, family history of POP, history of respiratory diseases with chronic cough, and connective tissue or collagen diseases.

Participants were classified as white, black, Asian, or mixed. Mixed includes those with physical features and background that do not fit in any other category, which therefore prevents a precise differentiation among ethnic groups. A substantial part of the Brazilian population resulted from racial miscegenation.

Sampling and genotyping

We collected 10 ml of peripheral blood from each participant for genetic evaluation, which was then sent to the laboratory for analysis. Genomic DNA was extracted from peripheral leukocytes and purified using a commercially available kit (Illustra™ blood genomic Prep Mini Spin Kit, GE Healthcare, Buckinghamshire, UK).

Identification of rs2165241 LOXL-1 polymorphism was done using real-time reverse transcriptase polymerase chain reaction (RT-PCR) (Step One Plus Real Time PCR System, Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) using 400 ng DNA for each reaction. For amplification, Taqman® Universal PCR Master Mix II (Applied Biosystems) and commercially obtained test solution containing the polymorphism were used. Fifty cycles of fluorescent amplification were performed in the reactions. At the conclusion of the RT-PCR reaction, genotyping results were plotted in a graph of the Step One Plus Real Time PCR System software and exported to an Excel file.

Statistical analysis

Sample and effect sizes were not calculated due to common issues on studies of genetic population: allele frequencies are largely unknown, as were SNPs in our study; common diseases such as POP may be due to genetic variants (SNPs) that frequently occur in multiple genetic factors, each contributing only small or moderate effects to disease manifestation.

Statistical analyses were performed using Statistical Package for Social Sciences (SPSS) version 22.0. Categorical demographic variables were described using simple frequencies and proportions and compared using the χ^2 test or, if necessary, Fisher's exact test or the likelihood ratio test.

The normality of the continuous variables was evaluated through the Kolmogorov Smirnov test. Variables with normal distribution were described in mean and standard deviation (SD), and the variables with non-normal distribution were described in median and minimum and maximum values. Comparisons between groups were performed using Student's t test or, when necessary, through the non-parametric Mann-Whitney test.

To verify that no evolutive factor affected the study population and that allele frequencies did not alter along the generations, Hardy-Weinberg equilibrium was calculated using the χ^2 test, with a significance level of 5%.

Association between polymorphism genotype and POP was estimated as odds ratio (OR) and respective 95% confidence intervals (CI 95%) using binary logistic regression model.

Women with undetermined genotype were excluded from the analysis. Since this proportion was relatively low (< 4%), it is expected that these exclusions would not have a relevant impact on results.

To verify whether variables that were different between groups at baseline could be considered independent risk factors for the development of the disease, OR and respective 95% CI were calculated using binary logistic regression models. The level of significance was 5% ($p \leq 0.05$).

Results

A total of 630 women were assessed: 346 (54,9%) cases and 284 (45,1%) controls. Clinical and demographic characteristics are described in Table 1. Univariate analysis have shown that mean age, parity, number of vaginal and forceps deliveries, weight of the largest newborn, prevalence of varicose veins, UI (including all types), mixed urinary incontinence (MUI), *diabetes mellitus*, *arterial hypertension* and family history of POP were higher in the POP group. There were no statistically significant differences between groups with regard to ethnicity, age at menopause, BMI, alterations related to collagen (such as hernias and collagenosis), pneumopathy and LOXL-1 genotype.

The percentage of patients with cesarean sections equal to or greater than 2 was significantly higher in the group of patients without disease (control), while the percentage of patients with cesarean sections equal to 0 was significantly higher in the group of patients with disease (case).

According to logistic regression analysis (Table 2) that included all variables not homogeneous between groups and clinically important, age, parity, number of vaginal deliveries, and family history of POP continued as risk factors for the development of the disease. Only varicose veins variable lost the significance of univariate analysis as a risk factor at 5% level, being significant at 10% level. The genotype LOXL-1, which did not present a significant relation with the development of the disease in the univariate analysis, remained without significance in the multivariate analysis.

The highest association was related to POP family history [OR = 2.27, CI 95% (1.41–3.66)], followed by vaginal delivery [OR = 2.17, CI 95% (1.62–2.82)], and age [OR = 1.09, CI 95% (1.07–1.12)] (Table 2).

A one-year increase in age corresponds to an increase of 9% (in model 1) or 10% (in model 2) in the risk of developing the disease. Regarding parity, the increase of one unit in the

number of cesarean sections corresponds to a decrease of 27% in the risk of developing the disease, while the increase of one unit in the number of normal deliveries corresponds to an increase of 117% (in model 1) or 118% (in model 2) in the risk of developing the disease.

Patients who reported a family history of the disease were 2.27 times more likely to develop POP (in model 1) or 2.28 times more likely to develop POP (in model 2) when compared to patients who denied family history of the disease.

According to the results of Table 3, at the significance level of 5%, with 1 degree of freedom, the value of the statistic χ^2 tabulated corresponds to 3.84. The Hardy-Weinberg calculation showed that the control population is in equilibrium, but the case population is not.

Table 1 Clinical and demographic characteristics of the study groups

Variables	Cases	Controls	Total	p-value
<i>AGE (YEARS)</i>				
Mean (SD)	68.05 (9.28)	60.46 (6.92)	64.63 (9.11)	< 0.001 [#]
Median (Minimum - Maximum)	68.5 (42 - 92)	59 (45 - 89)	64 (42 - 92)	
Total	346	283	629	
<i>ETHNICITY</i>				
Asiatic	5 (1.5)	5 (1.8)	10 (1.6)	0.916*
White	181 (54.2)	146 (52.1)	327 (53.3)	
Black	32 (9.6)	25 (8.9)	57 (9.3)	
Mixed	116 (34.7)	104 (37.1)	220 (35.8)	
Total	334 (100)	280 (100)	614 (100)	
<i>AGE AT MENOPAUSE (YEARS)</i>				
Mean (SD)	48.74 (5.47)	47.92 (5.82)	48.37 (5.64)	0.158 ^{##}
Median (Minimum - Maximum)	50 (30 - 78)	49 (24 - 65)	50 (24 - 78)	
Total	341	282	623	
<i>PARITY</i>				
Mean (SD)	4.56 (3.34)	2.27 (1.75)	3.53 (2.97)	< 0.001 ^{##}
Median (Minimum - Maximum)	4 (0 - 21)	2 (0 - 11)	3 (0 - 21)	
Total	345	283	628	
<i>NUMBER OF VAGINAL DELIVERY</i>				
Mean (SD)	4.27 (3.37)	1.4 (1.82)	2.98 (3.12)	< 0.001 ^{##}
Median (Minimum - Maximum)	3 (0 - 20)	1 (0 - 10)	2 (0 - 20)	
Total	345	283	628	
<i>NUMBER OF FÓRCEPS DELIVERY</i>				
0	274 (79.4)	256 (90.5)	530 (84.4)	< 0.001 *
1	64 (18.6)	21 (7.4)	85 (13.5)	
2 or more	7 (2)	6 (2.1)	13 (2.1)	
Total	345 (100)	283 (100)	628 (100)	
<i>NUMBER OF CESAREAN SECTION</i>				
0	263 (76.2)	146 (51.6)	409 (65.1)	< 0.001 *
1	68 (19.7)	67 (23.7)	135 (21.5)	
2 or more	14 (4.1)	70 (24.7)	84 (13.4)	
Total	345 (100)	283 (100)	628 (100)	
<i>WEIGHT OF LARGEST NEW BORN (g)</i>				
Mean (SD)	3781.08 (612.39)	3494.29 (649.73)	3651.87 (644.84)	< 0.001 ^{##}
Median	3800	3500	3600	
(Minimum - Maximum)	(2300 - 6000)	(1670 - 5085)	(1670 - 6000)	
Total	261	214	475	
<i>BODY MASS INDEX (kg/m²)</i>				
Mean (SD)	27.94 (4.48)	27.86 (4.9)	27.9 (4.68)	0.824 [#]
Median	27.55	27.27	27.48	
(Minimum - Maximum)	(16.01 - 47.04)	(18.27 - 51.73)	(16.01 - 51.73)	
Total	329	278	607	

Material e Métodos

ARTERIAL HYPERTENSION

No	97 (28)	125 (44,2)	222 (35,3)	< 0.001*
Yes	249 (72)	158 (55,8)	407 (64,7)	
Total	346 (100)	283 (100)	629 (100)	

DIABETES

No	250 (72.3)	242 (85.5)	492 (78.2)	< 0.001*
Yes	96 (27.7)	41 (14.5)	137 (21.8)	
Total	346 (100)	283 (100)	629 (100)	

STRIAE DISTENSAE

No	133 (66.8)	83 (62.4)	216 (65.1)	0.477*
Yes	66 (33.2)	50 (37.6)	116 (34.9)	
Total	199 (100)	133 (100)	332 (100)	

VARICOSE VEINS

No	217 (64.6)	209 (74.9)	426 (69.3)	0.007*
Yes	119 (35.4)	70 (25.1)	189 (30.7)	
Total	336 (100)	279 (100)	615 (100)	

COLLAGEN DISEASES

No	309 (89.6)	257 (91.1)	566 (90.3)	0.142***
Yes ^a	1 (0.3)	4 (1.4)	5 (0.8)	
Related ^b	35 (10.1)	21 (7.4)	56 (8.9)	
Total	345 (100)	282 (100)	627 (100)	

URINARY INCONTINENCE

No	156 (55.1)	234 (83.9)	390 (69.4)	< 0.001*
Yes	127 (44.9)	45 (16.1)	172 (30.6)	
Total	283 (100)	279 (100)	562 (100)	

TYPES OF URINARY INCONTINENCE

SUI ^c	84 (66.1)	32 (71.1)	116 (67.4)	0.028*
MUI ^d	25 (19.7)	2 (4.4)	27 (15.7)	
UII ^e	18 (14.2)	11 (24.4)	29 (16.9)	
Total	127 (100)	45 (100)	172 (100)	

PNEUMOPATHY

No	274 (79.2)	210 (74.2)	484 (76.9)	0.167*
Yes	72 (20.8)	73 (25.8)	145 (23.1)	
Total	346 (100)	283 (100)	629 (100)	

FAMILY HISTORY OF POP

No	232 (67.1)	224 (79.4)	456 (72.6)	0.002*
Yes	98 (28.3)	52 (18.4)	150 (23.9)	
Unknown	16 (4.6)	6 (2.1)	22 (3.5)	
Total	346 (100)	282 (100)	628 (100)	

LOXL-1 GENOTYPE rs2165241

Wild homozygous (CC)	123 (36.7)	102 (37.2)	225 (36.9)	0.152*
Heterozygous (CT)	133 (39.7)	124 (45.3)	257 (42.2)	
Homozygous with variant allele (TT)	79 (23.6)	48 (17.5)	127 (20.9)	
Total	335 (100)	274 (100)	609 (100)	

#t-Student test. ##Mann-Whitney test. *Chi-square test. **Fisher's exact test ***Likelihood ratio test. ^aCollagenoses. ^bHernias, aneurysms, valvulopathy, cardiomyopathy, colonic diverticular disease and Raynaud's syndrome. ^cStress urinary incontinence. ^dMixed urinary incontinence. ^eUrge urinary incontinence.

Table 2. Multivariate logistic regression analysis for association between clinical and demographic characteristics and pelvic organ prolapse (POP).

Variables	Estimate	OR (CI 95%)	p-value
Model 1			
AGE	0.09	1.09 (1.07; 1.12)	< 0.001
NUMBER OF CESAREAN SECTION	-0.32	0.73 (0.56; 0.95)	0.017
NUMBER OF VAGINAL DELIVERY	0.77	2.17 (1.67; 2.82)	< 0.001
FAMILY HISTORY OF POP (YES x NO)	0.82	2.27 (1.41; 3.66)	0.001
VARICOSE VEINS (YES x NO)	0.43	1.54 (0.98; 2.39)	0.058
Model 2			
AGE	0.09	1.10 (1.07; 1.12)	< 0.001
NUMBER OF CESAREAN SECTION	-0.32	0.73 (0.56; 0.95)	0.022
NUMBER OF VAGINAL DELIVERY	0.78	2.18 (1.67; 2.84)	< 0.001
FAMILY HISTORY OF POP (YES x NO)	0.83	2.28 (1.40; 3.71)	0.001
VARICOSE VEINS (YES x NO)	0.39	1.48 (0.94; 2.32)	0.091
LOXL-1 GENOTYPE [Homozygous with variant allele (TT) x Wild homozygous (CC) or heterozygous (CT)]	0.38	1.46 (0.88; 2.43)	0.147

Table 3. Hardy-Weinberg analysis

LOXL-1 Polymorphism rs2165241		Wild Homozygous (CC)	Heterozygous (CT)	Homozygous with variant allele (TT)	χ^2 calculated
Cases	Observed	123	133	79	11.99
	Expected	107.2	164.2	63.6	
Controls	Observed	102	124	48	0.93
	Expected	98.6	131.5	43.9	

Chi-square calculated, with p-value referring to 1 degree of freedom (χ^2 tabulated = 3.84).

Discussion

Pelvic floor disorders, including POP and SUI, are conditions that constitute an important health and quality of life problem that affects adult women in their reproductive and postmenopausal years.^{26,28}

Causes are multifactorial, including defective pelvic floor musculature and connective tissue weakness. Vaginal delivery and multiparity are among the major risk factors for POP, however, none of these and other factors explain the exact mechanism of the pathophysiology of this disorder.²⁶

Vergeldt TF et al., in a systematic review, found 10 articles about primary POP, where 30 risk factors were investigated. Parity, vaginal delivery, age and body mass index were significantly associated in at least two articles. Constipation and lung disease were not significantly associated with primary POP. Urge incontinence and mixed urinary incontinence showed a significant association whereas urinary incontinence surgery, stress urinary incontinence, and other forms of urinary incontinence were not significantly associated with primary POP. Diabetes mellitus, chronic disease, hysterectomy, previous hernia surgery and POP in pregnancy were evaluated and only diabetes mellitus was significantly associated with primary POP.³⁰

In our study, patients with genital prolapse had significantly higher mean age and parity, and a higher number of vaginal deliveries when compared to patients without prolapse. Regarding BMI, there was no difference between the groups. The percentages of arterial hypertension, diabetes mellitus, varicose veins, urinary incontinence (all types) and mixed urinary incontinence were significantly higher in the group of patients with disease than in the group of patients without disease.

Urinary incontinence is often associated with mild to moderate prolapse. However, more advanced prolapse conditions are less predictable in their association with UI. Women with more advanced prolapse may have less stress urinary incontinence (SUI) and may be more likely to manually reduce prolapse to urinate. Many clinicians believe that urinary urgency and urge incontinence have some relation to the severity of prolapse, although few studies have addressed this. The interaction and relationship between urinary symptoms and stage of prolapse remains unclear.³¹

Cesarean delivery proved to be a protective factor in our sample of patients. This result is in agreement with other works published in Brazilian and world literature, as described by Rodrigues et al. (OR = 0.43, 95% CI = 0.24-0.78).³² Lukacz et al. found that adjusted odds of prolapse increased with vaginal parity compared with cesarean section (OR 1.82, 95% CI 1.04-3.19).³³

Sze et al. have suggested that elective cesarean section is only partially effective in preventing pelvic organ prolapse. Cesarean delivery during active labor and vaginal delivery had a similar effect on maternal pelvic support. This indicates that development of prolapse occurred during the first and second stages of labor.³⁴

Regarding fetal macrosomia, Swift SE showed that 70.1% of women who had a macrosomic baby presented pelvic organ prolapse stage 2 (66.0%) or 3 (4.1%). In contrast, 53% of women who gave birth to a normal-weight child had stage 2 (50.8%) or 3 (3.0%) prolapse, with a statistically significant difference between groups ($P < .0001$).¹⁰ In our sample, the medians and / or distributions of the weight of the largest newborn of patients with prolapse were significantly higher than those of patients without disease.

Miedel et al. found that the prevalence of symptomatic prolapse was higher in women whose mothers or sisters underwent surgery for the correction of POP compared to women without a family history of the disease (OR 3.1, 95% CI 1.7-5.5).¹⁵ Similarly, in our analysis, patients who reported family history of genital prolapse presented 2.28-fold higher risk of developing the disease when compared to patients without family history.

Some studies suggest that forceps decreases the risk of pelvic floor disorders, but most agree that instrumental delivery has detrimental effects on pudendal nerve function and, particularly, forceps delivery is associated with high rates of perineal and anal sphincter lacerations. Magnetic resonance imaging showed that forceps greatly increased the risk of injury to the levator ani muscle.³⁵ Our results suggest an association between forceps delivery and pelvic floor dysfunction, since the percentage of patients who had 1 forceps delivery was significantly higher in the group of patients with prolapse than in the control group.

Several studies have investigated the possible genetic role of pelvic floor dysfunction in women.²⁶ Structures that compose the pelvic floor support apparatus were analyzed in animal and human studies in order to investigate molecular and biochemical alterations underlying POP. Most studies have focused on the analysis of connective tissue components and are based on the hypothesis that abnormal connective tissue of the pelvic floor is associated with POP either as a cause or effect.³⁶

Different groups have searched for genetic markers of POP using genome-wide association study, SNP studies and linkage in recent years. Genes related to ECM metabolism, which have previously been identified in pelvic floor tissues of women with POP, are potential candidates.³⁷

Liu et al. showed that mutant mice without LOXL-1 developed complex and severe pelvic floor disorders. Since there was a lag of 1 to 3 days between parturition and the appearance of prolapse, muscle contraction during childbirth was unlikely to play a direct role. However, it was clear that pregnancy and parturition are fundamental risk factors for the development of pelvic floor disorders in the mutant mice. As LOXL-1 is dedicated to the synthesis of elastic fibers, it has been concluded that the defects of these fibers underlie the primary pathophysiology of pelvic floor disorders in mutant mice.²⁸

Gene expression measurements for LOX and FIB-5 were made in tissue of 31 individuals with prolapse and 27 individuals with normal support. mRNA expression levels of the LOX, LOXL1 and LOXL2 genes were significantly decreased by 8.2-fold \pm 3.4, 5.0-fold \pm 1.7 and 15.2-fold \pm 5.2, respectively (mean \pm standard deviation) in patients with prolapse versus controls ($p < 0.05$). FIB-5 mRNA expression level was increased 3.1-fold \pm 0.7 ($p = 0.047$) in the tissues of patients with prolapse compared to controls.¹⁷

Santos et al. did not find any association between DNA polymorphisms rs2236479 of COL18A1 and rs2862296 of LOXL-4 with advanced POP in Brazilian women. However, the study suggests that homozygous genotype for the allele polymorphism (GG) of the LOXL-4 gene may attribute a protective factor to the occurrence of POPs, although results have not reached statistical significance. These results should be interpreted with caution because of the limited sample size.³⁷

Neupane et al. analyzed the human LOXL1 coding sequence for SNPs in POP patients in comparison with asymptomatic women. Of the 6 sequence variations identified, none were found to differ significantly in frequency between the groups. However, the size of the study population (66 patients) may not have been large enough to detect a significant difference between patients with POP and controls.³⁸

Alarab et al. performed vaginal tissue biopsy samples from 15 patients with POP and 11 matched controls for age (42.9 vs. 44.9 years), race (white), body mass index (27.5 vs. 29.2) and phase of the menstrual cycle (proliferative). LOX, LOXL1 and LOXL3 mRNA levels were significantly reduced in prolapse patients compared to control patients ($P = 0.005$, 0.0008 and 0.001, respectively).¹¹

One of the basic relationships in population genetics is expressed by the assertion that in a large random mating population in which two alleles A and A' occur at the frequencies p e q ($=1-p$) it is expected that the three types AA, AA' and A'A' remain in equilibrium from generation to generation at the frequencies of p^2 , $2pq$ and q^2 , in the absence of mutation or selection. This theorem is known as the Hardy-Weinberg law.³⁹

When studying associations between genetic mutations and diseases, the Hardy-Weinberg (HW) equilibrium is a key element. Controls have the function of representing the general population in case-control studies, therefore, the sample of controls must be in HW equilibrium. Departure from HW equilibrium in cases suggests an association between mutation and disease.⁴⁰

The distribution of the genotypes for LOX-1 differs significantly from that predicted by the Hardy-Weinberg equilibrium in the case group. Among the factors that interfere in this balance, natural selection, preferential marriages, and gene flow due to migrations may be

influencing the lack of heterozygotes. We consider the hypothesis that the great ethnic miscegenation in Brazil may have impacted on our results.

Two categories of HW-departure were studied: HW-departure associated with loss of heterozygosity and HW-departure associated with gain of heterozygosity. The first one, which is the case of our study, may be explained by natural or biological causes, including genomic deletions, population stratification and inbreeding. On the other hand, HW departure associated with gain of heterozygosity, may indicate genotype error and the HW test must be refined and combined with the analysis of observed heterozygosity frequencies for the detection of genotyping error.⁴¹

While the Hardy-Weinberg formula is very useful in describing the completely randomized situation, it is a rare natural population that is in fact in Hardy-Weinberg equilibrium. Mating is not random and the populations are subjected to other evolutionary forces, such as migration, genetic drift and natural selection.⁴² Many other causes may significantly restrict partner selection, including socio-economic, geographic, religious, political, and ethnic affiliations.⁴¹

There are few studies published in the Brazilian and world literature evaluating the association between the polymorphism of LOXL-1 and POP in humans, which makes our study important. In addition, the evaluation of cases and controls was performed through direct physical examination and classification according to the POP-Q. Among the limitations, we recognize the relatively small sample size and the departure from Hardy-Weinberg equilibrium in the case group.

Conclusion

- Excluding cases where genotype was undetermined (<4%), the frequency of the polymorphism rs2165241 of LOXL-1 in our study population was 63.1%, among them 42.2% were heterozygous (CT) and 20.9% homozygous with variant allele (TT).
- Although there is much evidence to the development of pelvic organ prolapse from the dysfunction of elastin and LOXL-1 protein, our study suggests there is no association between DNA polymorphism rs2165241 of LOXL-1 and advanced POP in the Brazilian population.
- Age, number of vaginal births and family history are risk factors for the disease. Cesarean section was shown to be a protective factor.

References

1. Liu G, Daneshgari F, Li M, Lin D, Lee U, Li T, et al. Bladder and urethral function in pelvic organ prolapsed lysyl oxidase like-1 knockout mice. *BJU Int.* 2007;100(2):414–8.
2. Allen-Brady K, Cannon-Albright L, Farnham JM, et al. Identification of six loci associated with pelvic organ prolapse using genome-wide association analysis. *Obstet Gynecol.* 2011;118(6):1345–53.
3. Haylen BT, Maher CF, Barber MD, et al. An international Urogynecological association (IUGA) / international continence society (ICS) joint report on the terminology for female pelvic organ prolapse (POP). *Int Urogynecol J.* 2016; 27:165–94.

-
4. Tinelli A, Malvasi A, Rahimi S, Negro R, Vergara D, Martignago R, et al. Age-Related Pelvic Floor Modifications and Prolapse Risk Factors in Postmenopausal Women. *Menopause*. 2010;17(1):204–12.
 5. Giarenis I, Robinson D. Prevention and Management of Pelvic Organ Prolapse. *F1000Prime Reports*. 2014; 6: 77.
 6. Ferrel G, Lu M, Stoddard P, Sammel MD, Romero R, Strauss III JF, et al. A Single Nucleotide Polymorphism in the Promoter of the LOXL1 Gene and Its Relationship to Pelvic Organ Prolapse and Preterm Rupture of Membranes. *ReprodSci*. 2009;16(5):438-46.
 7. Altman D, Forsman M, Falconer C, Lichtenstein P. Genetic influence on stress urinary incontinence and pelvic organ prolapse. *Eur Urol*. 2008; 54(4): 918–23.
 8. Bump RC, Mattiasson A, Bo K, Brubaker LP, DeLancey JO, Klarskov P, et al. The standardization of terminology of female pelvic organ prolapse and pelvic floor dysfunction. *Am J Obstet Gynecol*. 1996;175(1):10-7.
 9. Mant J, Painter R, Vessey M. Epidemiology of genital prolapse: observations from the Oxford family planning association study. *Br J Obstet Gynecol*. 1997;104(5):579–85.
 10. Swift SE. The distribution of pelvic organ support in a population of female subjects seen for routine gynecologic health care. *Am J Obstet Gynecol*. 2000;183(2):277-85.
 11. Alarab M, Bortolini MA, Drutz H, Lye S, Shynlova O. LOX family enzymes expression in vaginal tissue of premenopausal women with severe pelvic organ prolapse. *Int Urogynecol J*. 2010;21(11): 1397–404.
 12. Lince SL, van Kempen LC, Vierhout ME, Kluivers KB. A systematic review of clinical studies on hereditary factors in pelvic organ prolapse. *Int Urogynecol J*. 2012;23(10):1327-36.
 13. Schaffer JJ, Wai CY, Boreham MK. Etiology of pelvic organ prolapse. *Clin Obstet Gynecol*. 2005;48:639–47.
 14. Alperin M, Debes K, Abramowitch S, Meyn L, Moalli PA. LOXL1 deficiency negatively impacts the biomechanical properties of the mouse vagina and supportive tissues. *Int Urogynecol J*. 2008;19(7):977–86.
 15. Miedel A, Tegerstedt G, Maehle-Schmidt M, Nyrén O, Hammarström M. Nonobstetric Risk Factors for Symptomatic Pelvic Organ Prolapse. *Obstet Gynecol*. 2009;113(5):1089-97.
 16. Buchsbaum GM, Duecy EE, Kerr LA, Huang LS, Perevich M, Guzick DS. Pelvic organ prolapse in nulliparous women and their parous sisters. *Obstet Gynecol*. 2006;108(6):1388-93.
 17. Klutke J, Ji Q, Campeau J, Starcher B, Felix JC, Stanczyk FZ, Klutke C. Decreased endopelvic fascia elastin content in uterine prolapse. *Acta Obstet Gynecol Scand*. 2008;87(1):111-5.
 18. Brady KA, Norton PA, Farnham JM, Teerlink C, Albright LA. Significant Linkage Evidence for a Predisposition Gene for Pelvic Floor Disorders on Chromosome 9q21. *Am J Hum Genet*. 2009;84(5):678-82.
 19. Kerkhof MH, Hendriks L, Brölmann HA. Changes in connective tissue in patients with pelvic organ prolapse—a review of the current literature. *Int Urogynecol J*. 2009;20(4):461-74.
-

-
20. Man WC, Ho JY, Wen Y, Sokol ER, Polan ML, Chen B. Is lysyl oxidase-like protein-1, alpha-1 antitrypsin, and neutrophil elastase site specific in pelvic organ prolapse? *Int Urogynecol J Pelvic Floor Dysfunct.* 2009;20(12):1423-9.
 21. Yamamoto K, Yamamoto M, Akazawa K, Tajima S, Wakimoto H, Aoyagi M. Decrease in elastin gene expression and protein synthesis in fibroblasts derived from cardinal ligaments of patients with prolapsus uteri. *Cell Biol Int* 1997;21(9):605-11.
 22. Ewies AA, Al-Azzawi F, Thompson J. Changes in extracellular matrix proteins in the cardinal ligaments of postmenopausal women with or without prolapse: a computerized immunohistomorphometric analysis. *Hum Reprod.* 2003;18(10):2189-95.
 23. Chen B, Wen Y, Polan ML. Elastolytic activity in women with stress urinary incontinence and pelvic organ prolapse. *Neurourol Urodyn.* 2004;23(2):119-26.
 24. Karam JA, Vazquez DV, Lin VK, Zimmern PE. Elastin expression and elastic fibre width in the anterior vaginal wall of postmenopausal women with and without prolapse. *BJU Int.* 2007;100(2):346-50.
 25. Goepel C. Differential elastin and tenascin immunolabeling in the uterosacral ligaments in postmenopausal women with and without pelvic organ prolapse. *Acta Histochem.* 2007;110(3):204-9.
 26. Ozbek E, Polat EC, Ozcan L, Otunctemur A, Emrence Z, Ustek D. TT polymorphism in rs2165241 and rs1048661 region in lysyl oxidase like-1 gene may have a role in stress urinary incontinence physiopathology. *J Obstet Gynaecol Res.* 2013;39(1):237-42.
 27. Lemmelä S, Forsman E, Onkamo P, Nurmi H, Laivuori H, Kivelä T, et al. Association of LOXL1 gene with Finnish exfoliation syndrome patients. *J Hum Genet.* 2009;54(5):289-97.
 28. Liu X, Zhao Y, Pawlyk B, Damaser M, Li T. Failure of Elastic Fiber Homeostasis Leads to Pelvic Floor Disorders. *Am J Pathol.* 2006;168(2):519-28.
 29. Liu X, Zhao Y, Gao J, Pawlyk B, Starcher B, Spencer JA, et al. Elastic fiber homeostasis requires lysyl oxidase-like 1 protein. *Nat Genet.* 2004;36(2):178-82.
 30. Vergeldt TFM, Weemhoff M, Int'Hout J, Kluivers KB. Risk Factors for Pelvic Organ Prolapse and Its Recurrence: A Systematic Review. *Int Urogynecol J.* 2015;26(11):1559-73.
 31. Brubaker L, Rickey L, Xu Y, Markland A, Lemack G, Ghetti C, et al. Symptoms of Combined Prolapse and Urinary Incontinence in Large Surgical Cohorts. *Obstet Gynecol.* 2010;115(2 Pt 1):310-6.
 32. Rodrigues AM, Oliveira LM, Martins KF, Roy CAD, Sartori MGF, Girão MJBC, et al. Fatores de risco para o prolapso genital em uma população brasileira. *Rev Bras Ginecol Obstet.* 2009;31(1): 17-21.
 33. Lukacz ES, Lawrence JM, Contreras R, Nager CW, Luber KM. Parity, mode of delivery, and pelvic floor disorders. *Obstet Gynecol.* 2006;107(6): 1253-60.
 34. Sze EH, Sherard GB, Dolezal JM. Pregnancy, Labor, Delivery, and Pelvic Organ Prolapse. *Obstet Gynecol.* 2002;100(5 Pt 1): 981-6.
-

35. Leijonhufvud A, Lundholm C, Cnattingius S, Granath F, Andolf E, Altman D. Risks of stress urinary incontinence and pelvic organ prolapse surgery in relation to mode of childbirth. *Am J Obstet Gynecol*. 2011;204(1):70.e1-7.
 36. Bortolini MAT, Rizk DEE. Genetics of pelvic organ prolapse: crossing the bridge between bench and bedside in Urogynecologic research. *Int Urogynecol J*. 2011;22(10):1211–9.
 37. Dos Santos RGM, Pepicelli FCA, Batista NC, de Carvalho CV, Bortolini MAT, Castro RA. Collagen XVIII and LOXL-4 polymorphisms in women with and without advanced pelvic organ prolapse. *Int Urogynecol J*. 2018;29(6):893-8.
 38. Neupane R, Sadeghi Z, Fu R, Hagstrom SA, Moore CK, Daneshgari F. Mutation screen of LOXL1 in patients with female pelvic organ prolapse. *Female Pelvic Med Reconstr Surg*. 2014;20(6):316-21.
 39. Stern C. The Hardy-Weinberg Law. *Science*. 1943;97(2510):137–8.
 40. Llorca J, Prieto-Salceda D, Combarros O, Dierssen-Sotos T, Berciano J. Riesgos competitivos de muerte y equilibrio de Hardy-Weinberg en estudios de casos y controles sobre asociación entre genes y enfermedades. *Gac Sanit*. 2005;19(4): 321-4.
 41. Chen B, Cole JW, Grond-Ginsbach C. Departure from Hardy Weinberg Equilibrium and Genotyping Error. *Front Genet*. 2017;8:1-6.
 42. Stark AE. Stages in the evolution of the Hardy-Weinberg law. *Genet Mol Biol*. 2006;29(4): 589-94.
-

4 RESULTADOS

O total de 630 mulheres foram avaliadas: 346 (54,9%) casos e 284 (45,1%) controles. As características clínicas e demográficas estão descritas na tabela 1. Análises univariadas mostraram que idade, paridade, número de partos vaginais, número de fórceps, peso do maior recém-nascido, hipertensão arterial (HAS), diabetes mellitus (DM), varizes, incontinência urinária (incluindo todos os tipos), incontinência urinária mista (IUM) e história familiar da doença foram maiores no grupo POP. Não houve diferenças estatísticas entre os grupos quanto à etnia, idade da menopausa, IMC, alterações relacionadas ao colágeno (como hérnias e collagenoses), pneumopatia e genótipo LOXL-1.

Tabela 1 – Comparação entre Desenvolvimento da doença em relação às variáveis

Variáveis por Grupo	Caso	Controle	Total	p-valor
IDADE (anos)				
Média (Desvio padrão)	68,05 (9,28)	60,46 (6,92)	64,63 (9,11)	< 0,001 [#]
Mediana (Mínimo - Máximo)	68,5 (42 - 92)	59 (45 - 89)	64 (42 - 92)	
Total	346	283	629	
RAÇA				
Amarela	5 (1,5)	5 (1,8)	10 (1,6)	0,916 [*]
Branca	181 (54,2)	146 (52,1)	327 (53,3)	
Negra	32 (9,6)	25 (8,9)	57 (9,3)	
Parda	116 (34,7)	104 (37,1)	220 (35,8)	
Total	334 (100)	280 (100)	614 (100)	
IDADE DA MENOPAUSA (anos)				
Média (Desvio padrão)	48,74 (5,47)	47,92 (5,82)	48,37 (5,64)	0,158 ^{##}
Mediana (Mínimo - Máximo)	50 (30 - 78)	49 (24 - 65)	50 (24 - 78)	
Total	341	282	623	
PARIDADE				
Média (Desvio padrão)	4,56 (3,34)	2,27 (1,75)	3,53 (2,97)	< 0,001 ^{##}
Mediana (Mínimo - Máximo)	4 (0 - 21)	2 (0 - 11)	3 (0 - 21)	
Total	345	283	628	
PARTOS VAGINAIS				
Média (Desvio padrão)	4,27 (3,37)	1,4 (1,82)	2,98 (3,12)	< 0,001 ^{##}
Mediana (Mínimo - Máximo)	3 (0 - 20)	1 (0 - 10)	2 (0 - 20)	
Total	345	283	628	
FÓRCEPS				
0	274 (79,4)	256 (90,5)	530 (84,4)	< 0,001 [*]
1	64 (18,6)	21 (7,4)	85 (13,5)	
2 ou mais	7 (2)	6 (2,1)	13 (2,1)	
Total	345 (100)	283 (100)	628 (100)	
CESÁREAS				
0	263 (76,2)	146 (51,6)	409 (65,1)	< 0,001 [*]
1	68 (19,7)	67 (23,7)	135 (21,5)	
2 ou mais	14 (4,1)	70 (24,7)	84 (13,4)	
Total	345 (100)	283 (100)	628 (100)	
PESO DO MAIOR RN (g)				
Média (Desvio padrão)	3781,08 (612,39)	3494,29 (649,73)	3651,87 (644,84)	< 0,001 ^{##}
Mediana	3800	3500	3600	
(Mínimo - Máximo)	(2300 - 6000)	(1670 - 5085)	(1670 - 6000)	
Total	261	214	475	
ÍNDICE DE MASSA CORPORAL (kg/m ²)				
Média (Desvio padrão)	27,94 (4,48)	27,86 (4,9)	27,9 (4,68)	0,824 [#]
Mediana	27,55	27,27	27,48	
(Mínimo - Máximo)	(16,01 - 47,04)	(18,27 - 51,73)	(16,01 - 51,73)	
Total	329	278	607	
HIPERTENSÃO ARTERIAL				
Não	97 (28)	125 (44,2)	222 (35,3)	< 0,001 [*]
Sim	249 (72)	158 (55,8)	407 (64,7)	
Total	346 (100)	283 (100)	629 (100)	
DIABETES MELITUS				
Não	250 (72,3)	242 (85,5)	492 (78,2)	< 0,001 [*]
Sim	96 (27,7)	41 (14,5)	137 (21,8)	
Total	346 (100)	283 (100)	629 (100)	

Continua...

...continuação

Variáveis por Grupo	Caso	Controle	Total	p-valor
ESTRIAS				
Não	133 (66,8)	83 (62,4)	216 (65,1)	0,477*
Sim	66 (33,2)	50 (37,6)	116 (34,9)	
Total	199 (100)	133 (100)	332 (100)	
VARIZES				
Não	217 (64,6)	209 (74,9)	426 (69,3)	0,007*
Sim	119 (35,4)	70 (25,1)	189 (30,7)	
Total	336 (100)	279 (100)	615 (100)	
DOENÇAS DO COLÁGENO				
0 – Não	309 (89,6)	257 (91,1)	566 (90,3)	0,142***
1 – Sim ^a	1 (0,3)	4 (1,4)	5 (0,8)	
2 – Relacionadas ^b	35 (10,1)	21 (7,4)	56 (8,9)	
Total	345 (100)	282 (100)	627 (100)	
IU^c				
Não	156 (55,1)	234 (83,9)	390 (69,4)	< 0,001*
Sim	127 (44,9)	45 (16,1)	172 (30,6)	
Total	283 (100)	279 (100)	562 (100)	
Tipo de IU				
1 – IUE ^d	84 (66,1)	32 (71,1)	116 (67,4)	0,028*
2 – IUM ^e	25 (19,7)	2 (4,4)	27 (15,7)	
3 – IUU ^f	18 (14,2)	11 (24,4)	29 (16,9)	
Total	127 (100)	45 (100)	172 (100)	
PNEUMOPATIA				
0 – Não	274 (79,2)	210 (74,2)	484 (76,9)	0,167*
1 – Sim	72 (20,8)	73 (25,8)	145 (23,1)	
Total	346 (100)	283 (100)	629 (100)	
ANTECEDENTE FAMILIAR POP				
0 – Não	232 (67,1)	224 (79,4)	456 (72,6)	0,002*
1 – Sim	98 (28,3)	52 (18,4)	150 (23,9)	
2 – Não sabe	16 (4,6)	6 (2,1)	22 (3,5)	
Total	346 (100)	282 (100)	628 (100)	
GENÓTIPO LOXL-1 rs2165241				
Homozigoto selvagem (CC)	123 (36,7)	102 (37,2)	225 (36,9)	0,152*
Heterozigoto (CT)	133 (39,7)	124 (45,3)	257 (42,2)	
Homozigoto com alelo variante (TT)	79 (23,6)	48 (17,5)	127 (20,9)	
Total	335 (100)	274 (100)	609 (100)	

#Teste t-Student; ##Teste de Mann-Whitney; *Teste Qui-quadrado; **Teste Exato de Fisher; ***Teste da Razão de verossimilhança; ^aColagenoses; ^bHérnias, aneurismas, valvopatias, miocardiopatia, doença diverticular do cólon e síndrome de Raynaud; ^cIncontinência urinária; ^dIncontinência urinária de esforço; ^eIncontinência urinária mista; ^fIncontinência urinária de urgência.

O percentual de pacientes com número de cesáreas igual ou maior que 2 foi significativamente maior no grupo de pacientes sem doença (controle), enquanto que o percentual de pacientes com número de cesáreas igual a 0 foi significativamente maior no grupo de pacientes com doença (caso).

De acordo com a análise de regressão logística, que incluiu todas as variáveis não homogêneas entre os grupos nas comparações univariadas e que são clinicamente importantes, idade, paridade, número de partos vaginais e antecedente familiar de POP continuaram apresentando relação significativa como fatores de risco para o desenvolvimento da doença. Apenas a variável varizes perdeu a significância da análise univariada como fator de risco ao nível de 5%, sendo significativa ao nível de 10%. A variável Genótipo LOXL 1, que não apresentou relação significativa com o desenvolvimento da doença na análise univariada, continuou sem significância na análise multivariada.

Tabela 2 – Modelo de regressão logística multivariado, considerando como fatores de risco para o desenvolvimento da doença apenas as variáveis que apresentam relação significativa nas comparações univariadas entre grupos e que são clinicamente importantes

Variáveis	Estimativa	OR (IC95%)	p-valor
Modelo 1			
IDADE	0,09	1,09 (1,07; 1,12)	< 0,001
CESÁREAS	-0,32	0,73 (0,56; 0,95)	0,017
PARTOS VAGINAIS	0,77	2,17 (1,67; 2,82)	< 0,001
AF POP (Sim x Não)	0,82	2,27 (1,41; 3,66)	0,001
VARIZES (Sim x Não)	0,43	1,54 (0,98; 2,39)	0,058
Modelo 2			
IDADE	0,09	1,10 (1,07; 1,12)	< 0,001
CESÁREAS	-0,32	0,73 (0,56; 0,95)	0,022
PARTOS VAGINAIS	0,78	2,18 (1,67; 2,84)	< 0,001
AF POP (Sim x Não)	0,83	2,28 (1,40; 3,71)	0,001
VARIZES (Sim x Não)	0,39	1,48 (0,94; 2,32)	0,091
GENÓTIPO LOXL 1 (2: HOMO COM MUTAÇÃO x 0: HOMO SEM MUTAÇÃO ou 1: HETEROZIGOTO)	0,38	1,46 (0,88; 2,43)	0,147

Um aumento de um ano na idade corresponde a um aumento de 9% (no modelo 1) ou 10% (no modelo 2) no risco de desenvolvimento da doença. Em relação à paridade, o aumento de uma unidade no número de cesáreas

corresponde a uma queda de 27% (nos modelos 1 e 2) no risco de desenvolvimento da doença, enquanto o aumento de uma unidade no número de partos normais corresponde a um aumento de 117% (no modelo 1) ou 118% (no modelo 2) no risco de desenvolvimento da doença.

Pacientes que relatam história familiar da doença apresentaram 2,27 vezes mais chance de risco de desenvolvimento da doença (no modelo 1) ou 2,28 vezes mais chance de risco de desenvolvimento da doença (no modelo 2) quando comparados à pacientes que negaram história familiar da doença.

De acordo com os resultados da tabela 3, ao nível de significância de 5%, com 1 grau de liberdade, o valor da estatística χ^2 tabulada corresponde a 3,84. O cálculo de Hardy-Weinberg mostrou que a população de controles encontra-se em equilíbrio, porém a população de casos não.

Tabela 3 – Análise de Hardy-Weinberg (Cálculo do Equilíbrio de Hardy-Weinberg), com frequências observadas e esperadas dos genótipos relativos à LOXL-1 nos grupos (caso e controle)

Polimorfismo de LOXL-1		Homozigoto Selvagem (CC)	Heterozigoto (CT)	Homozigoto com Variante Polimórfica (TT)	χ^2 calculado
Casos	Observado	123	133	79	11,99
	Esperado	107,2	164,2	63,6	
Controles	Observado	102	124	48	0,93
	Esperado	98,6	131,5	43,9	

Realizado cálculo do qui-quadrado, com p-valor referente a 1 grau de liberdade (χ^2 tabulado = 3,84)

5 DISCUSSÃO

Os distúrbios do assoalho pélvico, incluindo POP e IUE, são condições que constituem um importante problema de saúde e qualidade de vida que afeta mulheres adultas em seus anos reprodutivos e pós-menopausa.^(27,42)

As causas são multifatoriais, incluindo defeito na musculatura do assoalho pélvico e fraqueza do tecido conjuntivo. Parto vaginal e multiparidade estão entre os principais fatores de risco para POP, no entanto, nenhum desses e outros fatores explicam o mecanismo exato da fisiopatologia dessa disfunção.⁽²⁷⁾

Vergeldt et al., numa revisão sistemática, encontraram 10 artigos sobre o POP primário, onde 30 fatores de risco foram investigados. Paridade, parto vaginal, idade e IMC foram significativamente associados em pelo menos dois artigos. Constipação e doença pulmonar não se associaram significativamente com o POP primário. Urgeincontinência e incontinência urinária mista mostrou uma associação significativa, enquanto a cirurgia de incontinência urinária, incontinência urinária de esforço, e outras formas de incontinência urinária não foram significativamente associadas com o POP primário. Diabetes mellitus, doença crônica, histerectomia, cirurgia prévia de hérnia e POP na gravidez foram avaliados e somente o diabetes mellitus foi significativamente associado com o POP primário.⁽⁷¹⁾

Em nosso estudo, as pacientes com prolapso genital apresentaram idade média e paridade significativamente maiores, além de maior número de partos vaginais quando comparadas com pacientes sem prolapso. Já em relação ao IMC, não houve diferença entre os grupos. Os percentuais de HAS, DM, varizes, incontinência urinária (todos os tipos) e IUM foram significativamente maiores no grupo de pacientes com doença que no grupo de pacientes sem doença.

A incontinência urinária é freqüentemente associada à presença de prolapso leve a moderado. No entanto, condições mais avançadas de prolapso são menos previsíveis em sua associação com a IU. Mulheres com prolapso mais avançado podem ter menos IUE e podem ser mais propensas a reduzir manualmente o prolapso para urinar. Muitos clínicos acreditam que a urgência urinária e a incontinência urinária de urgência (IUU) têm alguma relação com a gravidade do prolapso, embora poucos estudos tenham abordado isso. A interação e relação entre sintomas urinários e estágio do prolapso permanece obscura.⁽⁷¹⁾

Parto cesariano se mostrou como fator protetor em nossa amostra de pacientes. Esse resultado está de acordo com outros trabalhos publicados na literatura brasileira e mundial, conforme descrito por Rodrigues et al. (OR=0,43; IC95%=0,24-0,78).⁽¹⁴⁾ Lukacz et al. encontraram que as chances ajustadas de prolapso aumentaram com a paridade vaginal em comparação com parto cesáreo (OR 1,82; IC 95% 1,04-3,19).⁽¹⁹⁾

Já Sze et al. sugeriram que a cesárea eletiva é apenas parcialmente eficaz na prevenção do prolapso de órgãos pélvicos. O parto cesáreo durante o trabalho de parto ativo e o parto vaginal tiveram efeito semelhante no suporte pélvico materno. Isso indica que o prolapso se desenvolveu durante o primeiro e segundo estágios do trabalho de parto.⁽⁷²⁾

Em relação a macrossomia fetal, Swift demonstrou que 70,1% das mulheres tiveram um bebê macrossômico apresentaram prolapso de órgão pélvico estágio 2 (66,0%) ou 3 (4,1%); em contraste 53% das mulheres que pariram uma criança com peso normal tinham prolapso estágio 2 (50,8%) ou 3 (3,0%), com diferença estatisticamente significativa entre os grupos ($p<0,0001$).⁽¹³⁾ Em nossa amostra, as medianas e/ou distribuições dos valores do peso do maior recém-nascido das pacientes com prolapso foram significativamente maiores do que as dos pacientes sem doença.

Miedel et al. encontraram que a prevalência de prolapso sintomático foi maior nas mulheres cujas mães ou irmãs foram submetidas a cirurgia para correção de POP comparadas a mulheres sem história familiar da doença (OR 3,1, IC 95% 1,7–5,5).⁽²⁸⁾ De forma similar, em nossa análise, pacientes que relataram história familiar de prolapso genital apresentaram 2,28 vezes mais chance de risco de desenvolvimento da doença quando comparadas às pacientes sem história familiar.

Alguns estudos sugerem que o uso de fórceps diminui o risco de distúrbios do assoalho pélvico, porém a maioria concorda que o parto instrumental tem efeitos prejudiciais sobre a função do nervo podendo e, particularmente, o uso de fórceps está associado a altas taxas de lacerações do esfíncter perineal e anal. Imagens de ressonância magnética demonstraram que o uso de fórceps aumentou consideravelmente o risco de lesão do músculo levantador.⁽⁷³⁾ Nossos resultados

sugerem associação entre o uso de fórceps e disfunção do assoalho pélvico, uma vez que o percentual de pacientes que tiveram 1 parto fórceps foi significativamente maior no grupo de pacientes com prolapso que no grupo controle.

Diversos estudos investigaram o possível papel genético da disfunção do assoalho pélvico em mulheres.⁽²⁷⁾ As estruturas que compõem o aparato de suporte do assoalho pélvico foram analisadas em estudos animais e humanos com o objetivo de investigar as alterações moleculares e bioquímicas subjacentes ao POP. A maioria dos estudos concentrou-se na análise dos componentes do tecido conjuntivo e baseia-se na hipótese de que o tecido conjuntivo anormal do assoalho pélvico está associado ao POP como causa ou efeito.⁽⁷⁴⁾

Nos últimos anos, diferentes grupos pesquisaram marcadores genéticos de POP usando estudo de associação genômica ampla, estudos de SNPs e estudos de ligação genética. Genes relacionados ao metabolismo da MEC, que foram previamente identificados nos tecidos do assoalho pélvico de mulheres com POP, são candidatos potenciais.⁽⁷⁵⁾

Liu et al. mostraram que camundongos mutantes sem LOXL1 desenvolvem distúrbios do assoalho pélvico complexos e graves. Como há uma defasagem de 1 a 3 dias entre o parto e o surgimento de prolapso, é improvável que a contração muscular durante o parto desempenhe um papel direto. Porém é claro que a gravidez e o parto são fatores de risco fundamentais para o desenvolvimento de distúrbios do assoalho pélvico nesses camundongos. Como LOXL1 é dedicado à síntese de fibras elásticas, concluiu-se que os defeitos dessas fibras são subjacentes à fisiopatologia primária das desordens do assoalho pélvico nos camundongos mutantes.⁽⁴²⁾

Medidas de expressão gênica para LOX e FIB-5 foram feitas em tecido de 31 indivíduos com prolapso e 27 indivíduos com suporte normal. Os níveis de expressão de mRNA dos genes LOX, LOXL1 e LOXL2 foram significativamente diminuídos $8,2 \pm 3,4$ vezes, $5,0 \pm 1,7$ vezes e $15,2 \pm 5,2$ vezes (média \pm desvio-padrão), respectivamente, em pacientes com prolapso versus indivíduos normais ($p < 0,05$). O nível de expressão de mRNA do FIB-5 foi aumentado em $3,1 \pm 0,7$ vezes ($p = 0,047$) nos tecidos dos pacientes com prolapso.⁽³⁰⁾

Santos et al. não encontraram associação entre polimorfismos de DNA rs2236479 de COL18A1 e rs2862296 de LOXL-4 com POP avançado em mulheres brasileiras. No entanto, o estudo sugere que o genótipo homozigoto para o polimorfismo alelo (GG) do gene da LOXL-4 pode atribuir um fator de proteção para a ocorrência de POP, embora os resultados não tenham alcançado significância estatística. Esses resultados devem ser interpretados com cautela devido o tamanho limitado da amostra.⁽⁷⁵⁾

Alarab et al. realizaram amostras de biópsia de tecido vaginal de 15 pacientes com POP e 11 pacientes controles pareadas por idade (42,9 vs. 44,9 anos), raça (branca), IMC (27,5 vs. 29,2) e fase do ciclo menstrual (proliferativa). Os níveis de mRNA de LOX, LOXL1 e LOXL3 foram significativamente reduzidos em pacientes com prolapso em comparação com pacientes controle ($p=0,005$, $0,0008$ e $0,001$, respectivamente).⁽²²⁾

Uma das relações básicas na genética das populações é expressa pela afirmação de que em uma grande população de acasalamentos aleatórios em que dois alelos A e A' ocorrem nas frequências p e q ($= 1-p$) espera-se que os três tipos AA, AA' e A'A' permaneçam em equilíbrio de geração para geração nas frequências de p^2 , $2pq$ e q^2 , na ausência de mutação ou seleção. Este teorema é conhecido como lei de Hardy-Weinberg (HW).⁽⁷⁶⁾

Quando se estuda associações entre mutações genéticas e doenças, o equilíbrio de Hardy-Weinberg é um elemento-chave. Os controles têm a função de representar a população em geral em estudos de caso-controle, portanto, a amostra de controles deve estar em equilíbrio de HW. Já o desvio do equilíbrio nos casos sugere uma associação entre a mutação e a doença.⁽⁷⁷⁾

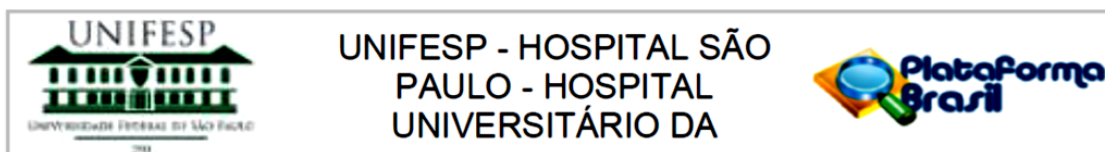
Duas categorias de desvios de HW foram estudadas: o desvio associado à perda de heterozigosidade e o desvio associado ao ganho de heterozigosidade. O primeiro, que é o caso do nosso estudo, pode ser explicado por causas naturais ou biológicas, incluindo deleções genômicas, estratificação populacional e endogamia. Por outro lado, o desvio associado ao ganho de heterozigosidade, pode indicar erro de genotipagem. Para a detecção desse erro, o teste de HW deve ser refinado e combinado com a análise das frequências de heterozigosidade observadas.⁷⁸

Embora a fórmula de Hardy-Weinberg seja muito útil para descrever a situação completamente aleatória, é rara uma população natural que esteja de fato em equilíbrio de Hardy-Weinberg. O acasalamento comumente não é aleatório e as populações são submetidas a outras forças evolutivas, como migração, deriva genética e seleção natural.⁷⁹ Fatores que podem restringir significativamente a seleção de parceiros incluem causas socioeconômicas, geográficas, religiosas, políticas e étnicas.⁷⁸

Existem poucos estudos publicados na literatura brasileira e mundial avaliando a associação entre o polimorfismo da LOXL-1 e POP em seres humanos, o que torna nosso trabalho importante. Além disso, a avaliação de casos e controles foi realizada através de exame físico direto e classificação de acordo com o POP-Q. Dentre as limitações, reconhecemos o tamanho relativamente pequeno da amostra e o desvio do equilíbrio de Hardy-Weinberg no grupo caso.

6 CONCLUSÃO

- Excluindo os casos onde o genótipo foi indeterminado (<4%), a frequência do polimorfismo rs2165241 do gene da LOXL-1 em nossa população de estudo foi de 63,1%, sendo 42,2% heterozigotos (CT) e 20,9% homozigotos com alelo variante (TT).
 - Embora existam muitas evidências do desenvolvimento de prolapso de órgãos pélvicos a partir da disfunção da elastina e da proteína LOXL-1, nosso estudo não demonstrou associação entre o polimorfismo rs2165241 do gene LOXL-1 e o POP avançado na população brasileira.
 - Idade, número de partos vaginais e histórico familiar são fatores de risco para a doença. Já o parto cesáreo se mostrou como fator protetor.
-

Anexo 1 – Aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa**PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP****DADOS DO PROJETO DE PESQUISA**

Título da Pesquisa: Estudo de Associação de Polimorfismos de DNA do gene codificador da LOX-1 e Prolapso de Órgãos Pélvicos em Mulheres Brasileiras

Pesquisador: Carolina Landim da Costa e Silva

Área Temática:

Versão: 2

CAAE: 96200518.3.0000.5505

Instituição Proponente: Escola Paulista de Medicina

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 2.936.879

Apresentação do Projeto:

Projeto CEP/UNIFESP n:0959/2018 (parecer final) (PROJETO APROVADO)

Lisiloxidasas (LOX) desempenham um papel crítico na formação e reparação da matriz extracelular (MEC) pela oxidação de resíduos de lisina em elastina e colágeno, iniciando assim a formação de ligações cruzadas covalentes, que estabilizam essas proteínas fibrosas. Estudos genéticos sugerem que o gene que codifica a LOX-1 pode estar envolvido no desenvolvimento de prolapso de órgão pélvico (POP). O objetivo deste trabalho é verificar a presença do polimorfismo rs2165241 em pacientes com e sem prolapso de órgãos pélvicos e analisar se há ou não associação com o desenvolvimento da doença.

-HIPÓTESE: Associação entre a presença do polimorfismo rs2165241 do gene codificador da LOX-1 e prolapso de órgãos pélvicos.

Objetivo da Pesquisa:

-OBJETIVO PRIMÁRIO: Verificar a potencial associação entre a presença do polimorfismo rs2165241 do gene codificador da LOX-1 com prolapso de órgãos pélvicos.

-OBJETIVO SECUNDÁRIO: Verificar a frequência do polimorfismo rs2165241 do gene codificador da LOX-1 em pacientes com prolapso de órgãos pélvicos acentuado e em mulheres sem prolapso. Verificar quais variáveis demográficas podem ser consideradas fatores de risco individuais para o

Endereço: Rua Francisco de Castro, 55

Bairro: VILA CLEMENTINO

CEP: 04.020-050

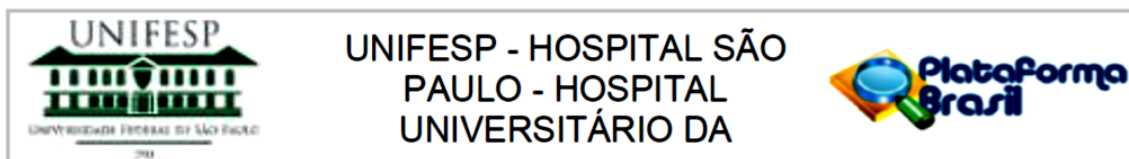
UF: SP

Município: SÃO PAULO

Telefone: (11)5571-1062

Fax: (11)5539-7162

E-mail: cep@unifesp.edu.br



Continuação do Parecer: 2.936.879

prolapso de órgãos pélvicos.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Em relação aos riscos e benefícios, o pesquisador declara:

-RISCOS: Riscos relacionados à coleta de sangue, como hematoma ou dor.

-BENEFÍCIOS: O conhecimento de susceptibilidade genética pode fornecer informações sobre a patogênese do prolapso de órgãos pélvicos e favorecer a prevenção e intervenção desta condição.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Trata-se de projeto de mestrado de Carolina Landim da Costa e Silva. Orientador: Prof. Dr. Rodrigo de Aquino Castro; Co-Orientadora: Dra. Maria Augusta Tezelli Bortolini. Projeto vinculado ao Departamento de Ginecologia, Campus São Paulo, Escola Paulista de Medicina, UNIFESP.

TIPO DE ESTUDO: observacional;

LOCAL: nos Setores de Uroginecologia e Cirurgia Vaginal e Climatério da Universidade Federal de São Paulo – Escola Paulista de Medicina.

PARTICIPANTES: Serão incluídas 600 mulheres atendidas nos Setores de Uroginecologia e Cirurgia Vaginal e Climatério. Tais pacientes serão distribuídas em dois grupos:

1-Grupo Caso: constituído por 300 pacientes com diagnóstico de prolapso de órgãos pélvicos estádios III ou IV (POP-Q).

- Critérios de Inclusão:- diagnóstico, por exame físico, de prolapso dos órgãos pélvicos nos estádios III e IV (POP-Q);- pacientes na pós-menopausa.

- Critérios de Exclusão:- atual doença maligna do trato genito-urinário;- realização prévia de radioterapia pélvica;- realização prévia de cirurgias pélvicas;- não permissão da paciente em realizar a coleta sanguínea após ter sido esclarecida sobre o estudo.

2-Grupo Controle: constituído por 300 pacientes sem prolapso dos órgãos pélvicos, ou seja, nos estádios 0 e I (POP-Q).

- Critérios de Inclusão:- pacientes com estadiamento de prolapso 0 e I (POP-Q) segundo exame físico e no período pós-menopausa.- pacientes na pós-menopausa.

- Critérios de Exclusão:- realização prévia de radioterapia pélvica;- atual doença maligna do trato genito-urinário;- pacientes com história ou tratamentos prévios de POP;- pacientes com história de cirurgias pélvicas prévias;- não permissão da paciente em realizar a coleta sanguínea após ter sido esclarecida sobre o estudo.

Endereço: Rua Francisco de Castro, 55

Bairro: VILA CLEMENTINO

CEP: 04.020-050

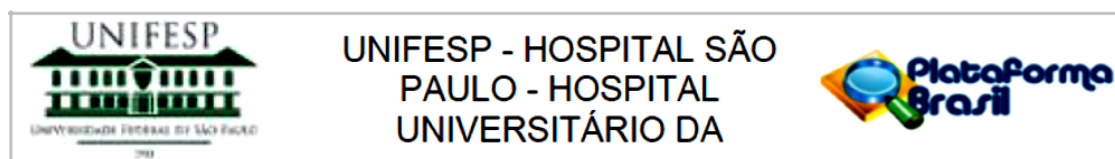
UF: SP

Município: SAO PAULO

Telefone: (11)5571-1062

Fax: (11)5539-7162

E-mail: cep@unifesp.edu.br



Continuação do Parecer: 2.936.879

PROCEDIMENTOS:

-Avaliação Clínica: As pacientes serão submetidas à anamnese completa, serão pesadas e terão suas estaturas medidas para o cálculo do índice de massa corpórea (IMC) e posteriormente submetidas ao exame ginecológico, em que será realizado o estadiamento do prolapso genital. -Coleta de Material Biológico: Serão colhidos 10 ml de sangue venoso de cada participante, em punção periférica de membro superior para a realização da extração do DNA.

-Extração do DNA: A extração do DNA genômico será realizada utilizando-se o kit comercial Illustra™ blood genomicPrep Mini Spin Kit (GE Healthcare, Buckinghamshire, UK).
(mais informações, ver projeto detalhado).

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

1- Foram apresentados os principais documentos: folha de rosto; projeto completo; cópia do cadastro CEP/UNIFESP, orçamento financeiro e cronograma apresentados adequadamente.

2-TCLE a ser aplicado aos participantes

3- outros documentos importantes anexados na Plataforma Brasil:

a)- autorização da coep (Pasta: outros- Submissão 2; Documento: OFICIOCOEP.pdf)

Recomendações:

Sem recomendações.

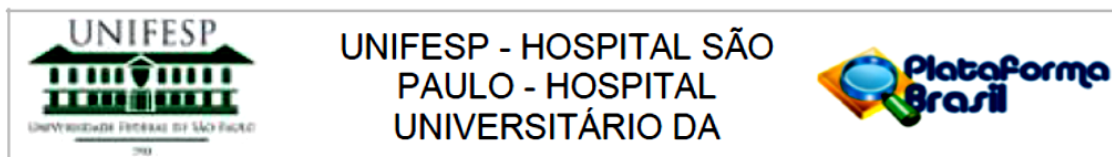
Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

1-Em relação ao TCLE:

a)- retirar a palavra "Eu" do dados iniciais sobre o participante (não está coerente, pois não é uma declaração do participante, mas sim um convite do pesquisador);

b)- readequar o item 8: a responsabilidade pela prestação de cuidados integrais de saúde pelo tempo que for necessário para o tratamento por danos não pode estar vinculada à comprovação de relação direta com a participação no estudo, devido à própria dificuldade prática em comprovar esse vínculo de imediato. Assim sendo, danos diretos ou indiretos, imediatos ou tardios, sofridos no decorrer da participação no estudo, devem ser imediatamente acompanhados e tratados pelo pesquisador e seu patrocinador mesmo que ainda não seja estabelecido nexos causal. Solicita-se adequação, ou seja, retirar: ".... diretamente causado pelos procedimentos ou tratamentos propostos neste estudo (em que haja comprovação de que a causa seja mesmo a realização desses procedimentos)." . Exemplo de fase correta: Se ocorrer qualquer problema ou dano pessoal, o (a)

Endereço: Rua Francisco de Castro, 55
Bairro: VILA CLEMENTINO CEP: 04.020-050
UF: SP Município: SAO PAULO
Telefone: (11)5571-1062 Fax: (11)5539-7162 E-mail: cep@unifesp.edu.br



Continuação do Parecer: 2.936.879

Sr (a) terá garantido o direito a tratamento imediato e gratuito na Instituição e terá direito a indenização determinada por lei.

c)- ao disponibilizar os dados dos pesquisadores, fornecer também nome completo do pesquisador e orientador, além de um e-mail e celular para contato.

d)-Atenção: o CEP/UNIFESP mudou de endereço: favor corrigir no TCLE. Novo endereço: Rua Prof. Francisco de Castro, n: 55, - 04020-050. O E-mail é: CEP@unifesp.edu.br. Os telefones continuam os mesmos (011-5571-1062; 011-5539-7162)

e)-no campo de assinaturas, além do campo para assinatura, inserir o nome do pesquisador que irá aplicar o TCLE.

RELATOR: PENDÊNCIAS ATENDIDAS

2 – Atualizar o cronograma para que a pesquisa inicie somente após a aprovação do CEP-UNIFESP.

RELATOR: PENDÊNCIAS ATENDIDAS

Considerações Finais a critério do CEP:

O CEP informa que a partir desta data de aprovação, é necessário o envio de relatórios parciais (semestralmente), e o relatório final, quando do término do estudo.

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BASICAS_DO_PROJETO_1142931.pdf	09/09/2018 03:45:49		Aceito
Outros	PENDENCIAS.docx	09/09/2018 03:43:48	Carolina Landim da Costa e Silva	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	PROJETODEPESQUISA.docx	09/09/2018 03:42:03	Carolina Landim da Costa e Silva	Aceito
Cronograma	CRONOGRAMA.docx	06/09/2018 21:41:17	Carolina Landim da Costa e Silva	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE.docx	06/09/2018 21:40:46	Carolina Landim da Costa e Silva	Aceito
Outros	DOCUMENTOCEP.pdf	15/08/2018 14:08:02	Carolina Landim da Costa e Silva	Aceito
Outros	OFICIOCOEP.pdf	15/08/2018 14:07:27	Carolina Landim da Costa e Silva	Aceito

Endereço: Rua Francisco de Castro, 55

Bairro: VILA CLEMENTINO

CEP: 04.020-050

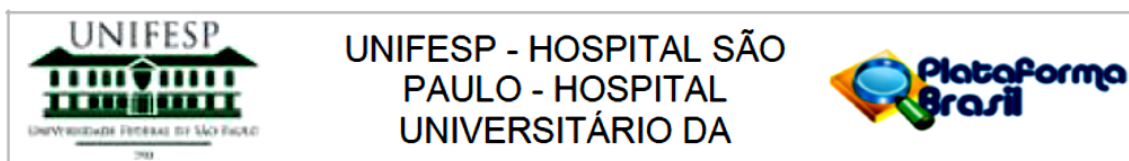
UF: SP

Município: SAO PAULO

Telefone: (11)5571-1062

Fax: (11)5539-7162

E-mail: cep@unifesp.edu.br



Continuação do Parecer: 2.936.879

Folha de Rosto	FOLHADEROSTOEPM.pdf	26/07/2018 17:47:19	Carolina Landim da Costa e Silva	Aceito
Orçamento	ORCAMENTO.docx	14/06/2018 19:26:49	Carolina Landim da Costa e Silva	Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

SAO PAULO, 03 de Outubro de 2018

Assinado por:
Miguel Roberto Jorge
(Coordenador(a))

Endereço: Rua Francisco de Castro, 55
Bairro: VILA CLEMENTINO CEP: 04.020-050
UF: SP Município: SAO PAULO
Telefone: (11)5571-1062 Fax: (11)5539-7162 E-mail: cep@unifesp.edu.br

Anexo 2 – TCLE

Página 1 de 3

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Nome: _____ RG: _____,
idade: _____ anos, estado civil: _____, residente na
_____, nº _____, bairro: _____,
cidade: _____, telefone _____.

Título do Projeto: “Estudo de Associação de Polimorfismo de DNA do gene codificador da LOX 1 e Prolapso de Órgãos Pélvicos em Mulheres Brasileiras”.

A senhora está sendo convidada a participar de um projeto de pesquisa para procurar alterações na sequência dos genes – DNA – com os quais nasceu e que podem ter-lhes sido transmitidos por seus pais como herança genética. Os genes que serão estudados têm relação com proteínas que participam da formação do colágeno e da elastina, que normalmente estão presentes em grande quantidade nos organismos humanos, formando vários tecidos e órgãos, incluindo os tecidos da vagina, que sustentam os órgãos (bexiga, útero e reto) em suas posições normais em nosso corpo. Quando o colágeno ou a elastina apresentam algum tipo de problema, as mulheres podem desenvolver prolapso destes órgãos, isto é, o útero, a bexiga ou o reto podem descer para fora da cavidade vaginal. As pacientes participantes deste estudo, como a senhora, deverão apresentar prolapso genital moderado ou acentuado, ou então a ausência desta condição, de forma que iremos comparar os genes que produzem o colágeno e a elastina para tentar entender os fatores genéticos que contribuem para a formação do prolapso.

1. Para a pesquisa, será realizada consulta médica, com medida de sua altura e peso a fim de calcular o índice de massa corporal (IMC). Após, será feito um exame ginecológico em que será verificada a presença ou não de prolapso genital e, caso haja, será feita a sua medição;
 2. Após a consulta médica, será realizada coleta única de 10ml de sangue de veia do membro superior, com material específico;
 3. Os materiais empregados na coleta serão descartáveis;
-

4. Os riscos do procedimento acima são a presença de dor e formação de um hematoma (“mancha roxa”) no local da coleta, havendo mínimo desconforto e nenhum risco à vida; também não haverá risco de danos morais, financeiros ou religiosos;
 5. Depois de coletado, o sangue será armazenado e analisado quanto à presença de alterações nos genes, e o excesso de material será desprezado após o fim da pesquisa. O material coletado terá finalidade única e exclusivamente científica;
 6. Não haverá benefício direto para a participante do projeto. Trata-se de pesquisa de alterações genéticas relacionadas ao prolapso genital que possam ser transmitidas de mãe para filha, a fim de que os resultados da pesquisa possam contribuir para futuras medidas de prevenção e de tratamento das pacientes afetadas pelo prolapso genital;
 7. As participantes não terão nenhuma despesa ao participar desse estudo, bem como não há compensação financeira relacionada à sua participação. Se existir qualquer despesa adicional, ela será paga pelo orçamento da pesquisa;
 8. Se ocorrer qualquer problema ou dano pessoal, a participante terá garantido o direito a tratamento imediato e gratuito na Instituição e terá direito a indenização determinada por lei;
 9. Seu nome será mantido em sigilo, armazenado em base de dados eletrônica confidencial, assegurando assim a sua privacidade. Se desejar, deverá ser informada dos resultados dessa pesquisa;
 10. Em qualquer etapa do estudo, você poderá ter acesso aos profissionais responsáveis pela pesquisa para esclarecimento de eventuais dúvidas: Carolina Landim da Costa e Silva (pesquisadora), e-mail carolinalandim@hotmail.com, telefone (11) 97597-2555; e Rodrigo de Aquino Castro (orientador), e-mail rodrigo.castro@uol.com.br, telefone (11) 99192-4774. Você pode entrar em contato com o Ambulatório de Uroginecologia e Cirurgia Vaginal no seguinte endereço: Rua Loefgreen, 1570 – Vila Clementino, telefone 5576-4879. Se você tiver alguma consideração ou dúvida sobre a ética da pesquisa, entre em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) – Rua Prof. Francisco de Castro, nº 55, - 04020-050. E-mail: CEP@unifesp.edu.br, telefone: 5571-1062, FAX: 5539-7162.
-

11. Caso a senhora deseje participar deste estudo voluntariamente, assine a declaração abaixo, referente ao Termo de Consentimento da sua participação no projeto informado. Este termo é elaborado em duas vias e ambas deverão ser assinadas, rubricadas pelo convidado a participar da pesquisa, ou por seu representante legal, assim como pelo pesquisador responsável, ou pela (s) pessoa (s) por ele delegada (s). Cada parte receberá uma via do documento.

DECLARAÇÃO DO PARTICIPANTE

Diante dos esclarecimentos prestados, concordo em participar do projeto: “Estudo de Associação de Polimorfismo de DNA do gene codificador da LOX 1 e Prolapso de Órgãos Pélvicos em Mulheres Brasileiras” na qualidade de voluntária.

Ficaram claros para mim quais são os propósitos do estudo, os procedimentos a serem realizados, seus desconfortos e riscos, as garantias de confidencialidade (sigilo) e de esclarecimentos permanentes. Ficou claro também que minha participação não me causará despesas e que tenho garantia do acesso a tratamento hospitalar quando necessário. Concordo voluntariamente em participar deste estudo e entendo que poderei retirar o meu consentimento a qualquer momento, antes ou durante o mesmo, sem penalidades, prejuízo ou perda de qualquer benefício que eu possa ter adquirido, ou no meu atendimento neste Serviço.

São Paulo, ____ de _____ de ____.

Assinatura da Paciente / Representante Legal

Assinatura da testemunha (voluntários menores de 18 anos,
analfabetos, semi-analfabetos ou portadores de deficiência auditiva e/ou visual)

Carolina Landim da Costa e Silva

Pesquisadora

8 REFERÊNCIAS

-
1. Liu G, Daneshgari F, Li M, Lin D, Lee U, Li T, et al. Bladder and urethral function in pelvic organ prolapsed lysyl oxidase like-1 knockout mice. *BJU Int.* 2007;100(2):414-8.
 2. Allen-Brady K, Cannon-Albright L, Farnham JM, et al. Identification of six loci associated with pelvic organ prolapse using genome-wide association analysis. *Obstet Gynecol.* 2011;118(6):1345-53.
 3. Haylen BT, Maher CF, Barber MD, et al. An international Urogynecological association (IUGA) / international continence society (ICS) joint report on the terminology for female pelvic organ prolapse (POP). *Int Urogynecol J.* 2016; 27:165-94.
 4. Tinelli A, Malvasi A, Rahimi S, Negro R, Vergara D, Martignago R, et al. Age-Related Pelvic Floor Modifications and Prolapse Risk Factors in Postmenopausal Women. *Menopause.* 2010;17(1):204-12.
 5. Giarenis I, Robinson D. Prevention and Management of Pelvic Organ Prolapse. *F1000Prime Reports.* 2014; 6:77.
 6. Ferrel G, Lu M, Stoddard P, Sammel MD, Romero R, Strauss III JF, et al. A Single Nucleotide Polymorphism in the Promoter of the LOXL1 Gene and Its Relationship to Pelvic Organ Prolapse and Preterm Rupture of Membranes. *ReprodSci.* 2009;16(5):438-46.
 7. Altman D, Forsman M, Falconer C, Lichtenstein P. Genetic influence on stress urinary incontinence and pelvic organ prolapse. *Eur Urol.* 2008; 54(4): 918-23.
 8. Wu JM, Matthews CA, Conover MM, Pate V, Jonsson Funk M. Lifetime risk of stress urinary incontinence or pelvic organ prolapse surgery. *Obstet Gynecol.* 2014;123(6):1201-6.
 9. DeLancey JO. The hidden epidemic of pelvic floor dysfunction: achievable goals for improved prevention and treatment. *Am J Obstet Gynecol.* 2005;192(5):1488-95.
 10. Olsen A, Smith V, Bergstrom J, Colling J, Clark A. Epidemiology of surgically managed pelvic organ prolapse and urinary incontinence. *Obstet Gynecol.* 1997;89(4):501-6.
 11. Bump RC, Mattiasson A, Bo K, Brubaker LP, DeLancey JO, Klarskov P, et al. The standardization of terminology of female pelvic organ prolapse and pelvic floor dysfunction. *Am J Obstet Gynecol.* 1996;175(1):10-7.
 12. Mant J, Painter R, Vessey M. Epidemiology of genital prolapse: observations from the Oxford family planning association study. *Br J Obstet Gynecol.* 1997;104(5):579-85.
-

-
13. Swift SE. The distribution of pelvic organ support in a population of female subjects seen for routine gynecologic health care. *Am J Obstet Gynecol*. 2000;183(2):277-85.
 14. Rodrigues AM, Oliveira LM, Martins KF, Roy CAD, Sartori MGF, Girão MJBC, et al. Fatores de risco para o prolapso genital em uma população brasileira. *Rev Bras Ginecol Obstet*. 2009;31(1): 17-21.
 15. Abramowitch SD, Feola A, Jallah Z, Moalli PA. Tissue Mechanics, Animal Models, and Pelvic Organ Prolapse: A Review. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol*. 2009;144 Suppl 1:S146-58.
 16. Carley ME, Turner RJ, Scott DE, Alexander JM. Obstetric history in women with surgically corrected adult urinary incontinence or pelvic organ prolapse. *J Am Assoc Gynecol Laparosc*. 1999;6(1):85-9.
 17. Gurel H, Gurel SA. Pelvic relaxation and associated risk factors: the results of logistic regression analysis. *Acta Obstet Gynecol Scand*. 1999;78(4):290-3.
 18. Hendrix SL, Clark A, Nygaard I, Aragaki A, Barnabei V, McTiernan A. Pelvic organ prolapse in the Women's Health Initiative: gravity and gravidity. *Am J Obstet Gynecol*. 2002;186(6):1160-6.
 19. Lukacz ES, Lawrence JM, Contreras R, Nager CW, Luber KM. Parity, mode of delivery, and pelvic floor disorders. *Obstet Gynecol*. 2006;107(6): 1253-60.
 20. Moalli PA, Jones Ivy S, Meyn LA, Zyczynski HM. Risk factors associated with pelvic floor disorders in women undergoing surgical repair. *Obstet Gynecol*. 2003;101(5 Pt 1):869-74.
 21. O'Boyle AL, Woodman PJ, O'Boyle JD, Davis GD, Swift SE. Pelvic Organ Support in Nulliparous Pregnant and Nonpregnant Women: A Case Control Study. *Am J Obstet Gynecol*. 2002;187(1):99-102.
 22. Alarab M, Bortolini MA, Drutz H, Lye S, Shynlova O. LOX family enzymes expression in vaginal tissue of premenopausal women with severe pelvic organ prolapse. *Int Urogynecol J*. 2010;21(11): 1397-404.
 23. Lince SL, van Kempen LC, Vierhout ME, Kluivers KB. A systematic review of clinical studies on hereditary factors in pelvic organ prolapse. *Int Urogynecol J*. 2012;23(10):1327-36.
 24. Bump RC, Norton PA. Epidemiology and natural history of pelvic floor dysfunction. *Obstet Gynecol Clin N Am*. 1998;25:723-46.
 25. Schaffer JI, Wai CY, Boreham MK. Etiology of pelvic organ prolapse. *Clin Obstet Gynecol*. 2005;48:639-47.
-

-
26. Alperin M, Debes K, Abramowitch S, Meyn L, Moalli PA. LOXL1 deficiency negatively impacts the biomechanical properties of the mouse vagina and supportive tissues. *Int Urogynecol J*. 2008;19(7):977-86.
 27. Ozbek E, Polat EC, Ozcan L, Otunctemur A, Emrence Z, Ustek D. TT polymorphism in rs2165241 and rs1048661 region in lysyl oxidase like-1 gene may have a role in stress urinary incontinence physiopathology. *J Obstet Gynaecol Res*. 2013;39(1):237-42.
 28. Miedel A, Tegerstedt G, Maehle-Schmidt M, Nyrén O, Hammarström M. Nonobstetric Risk Factors for Symptomatic Pelvic Organ Prolapse. *Obstet Gynecol*. 2009;113(5):1089-97.
 29. Buchsbaum GM, Duecy EE, Kerr LA, Huang LS, Perevich M, Guzick DS. Pelvic organ prolapse in nulliparous women and their parous sisters. *Obstet Gynecol*. 2006;108(6):1388-93.
 30. Klutke J, Ji Q, Campeau J, Starcher B, Felix JC, Stanczyk FZ, Klutke C. Decreased endopelvic fascia elastin content in uterine prolapse. *Acta Obstet Gynecol Scand*. 2008;87(1):111-5.
 31. Brady KA, Norton PA, Farnham JM, Teerlink C, Albright LA. Significant Linkage Evidence for a Predisposition Gene for Pelvic Floor Disorders on Chromosome 9q21. *Am J Hum Genet*. 2009;84(5):678-82.
 32. Persu C, Chapple CR, Cauni V, Gutue S, Geavlete P. Pelvic Organ Prolapse Quantification System (POP-Q) - a New Era in Pelvic Prolapse Staging. *J Med Life*. 2011;4 (1): 75-81.
 33. DeLancey JO. Anatomic aspects of vaginal eversion after hysterectomy. *Am J Obstet Gynecol*. 1992;166(6 Pt 1):1717-24; discussion 1724-8.
 34. Kerkhof MH, Hendriks L, Brölmann HA. Changes in connective tissue in patients with pelvic organ prolapse—a review of the current literature. *Int Urogynecol J*. 2009;20(4):461-74.
 35. Alperin M, Moalli PA. Remodeling of vaginal connective tissue in patients with prolapse. *Curr Opin Obstet Gynecol*. 2006;18(5):544-50.
 36. Bornstein P. Diversity of Function Is Inherent in Matricellular Proteins: An Appraisal of Thrombospondin 1. *J Cell Biol*. 1995;130 (3):503-6.
 37. Aumailley M, Gayraud B. Structure and Biological Activity of the Extracellular Matrix. *J Mol Med (Berl)*. 1998;76(3-4):253-65.
 38. Raines EW. The Extracellular Matrix Can Regulate Vascular Cell Migration, Proliferation, and Survival: Relationships to Vascular Disease. *Int J Exp Pathol*. 2000;81 (3):173-82.
-

-
39. ten Dijke P, Arthur HM. Extracellular Control of TGFbeta Signalling in Vascular Development and Disease. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2007;8(11):857-69.
 40. Yanagisawa H, Schluterman MK, Brekken RA. Fibulin-5, an Integrin-Binding Matricellular Protein: Its Function in Development and Disease. *J Cell Commun Signal.* 2009;3(3-4):337-47.
 41. Goepel C, Hefler L, Methfessel HD, Koelbl H. Periurethral Connective Tissue Status of Postmenopausal Women with Genital Prolapse with and without Stress Incontinence. *Acta Obstet Gynecol Scand.* 2003;82(7):659-64.
 42. Liu X, Zhao Y, Pawlyk B, Damaser M, Li T. Failure of Elastic Fiber Homeostasis Leads to Pelvic Floor Disorders. *Am J Pathol.* 2006;168(2):519-28.
 43. Hynes, RO. Extracellular Matrix: Not Just Pretty Fibrils. *Science.* 2009;326(5957): 1216-19.
 44. Mäki J.: Lysyl Oxidases: Cloning and Characterization of the Fourth and the Fifth Human Lysyl Oxidase Isoenzymes, and the Consequences of a Targeted Inactivation of the First Described Lysyl Oxidase Isoenzyme in Mice. 2002. <http://jultika.oulu.fi/files/isbn9514267397.pdf>. Accessed 15 May 2018.
 45. Eckes B, Zigrino P, Kessler D, Holtkotter O, Shephard P, Mauch C, et al. Fibroblast-matrix interactions in wound healing and fibrosis. *Matrix Biol.* 2000;19(4):325-32.
 46. Feldner Jr PC, Kobayashi EY, Sartori MGF, Nader HB, Baracat EC, Girão MJBC. Avaliação dos glicosaminoglicanos do tecido periuretral de pacientes com e sem prolapso genital. *Rev Assoc Med Bras.* 2008;54(2), 173-7.
 47. Sell DR, Monnier VM. Structure elucidation of a senescence cross-link from human extracellular matrix. Implication of pentoses in the aging process. *J Biol Chem.* 1989;264(36):21597-602.
 48. Jackson SR, Avery NC, Tarlton JF, Eckford SD, Abrams P, Bailey AJ. Changes in metabolism of collagen in genitourinary prolapse. *Lancet.* 1996;347(9016):1658-61.
 49. Keane DP, Sims TJ, Abrams P, Bailey AJ. Analysis of collagen status in premenopausal nulliparous women with genuine stress incontinence. *Br J Obstet Gynaecol.* 1997;104(9):994-8.
 50. Söderberg MW, Falconer C, Byström B, Malmström A, Ekman G. Young women with genital prolapse have a low collagen concentration. *Acta Obstet Gynecol Scand.* 2004;83(12):1193-8.
-

-
51. Man WC, Ho JY, Wen Y, Sokol ER, Polan ML, Chen B. Is lysyl oxidase-like protein-1, alpha-1 antitrypsin, and neutrophil elastase site specific in pelvic organ prolapse? *Int Urogynecol J Pelvic Floor Dysfunct.* 2009;20(12):1423-9.
 52. Yamamoto K, Yamamoto M, Akazawa K, Tajima S, Wakimoto H, Aoyagi M. Decrease in elastin gene expression and protein synthesis in fibroblasts derived from cardinal ligaments of patients with prolapsus uteri. *Cell Biol Int* 1997;21(9):605-11.
 53. Robb BW, Wachi H, Schaub T, Mecham RP, Davis EC. Characterization of an in vitro model of elastic fiber assembly. *Mol Biol Cell.* 1999;10(11):3595-605.
 54. Ewies AA, Al-Azzawi F, Thompson J. Changes in extracellular matrix proteins in the cardinal ligaments of postmenopausal women with or without prolapse: a computerized immunohistomorphometric analysis. *Hum Reprod.* 2003;18(10):2189-95.
 55. Chen B, Wen Y, Polan ML. Elastolytic activity in women with stress urinary incontinence and pelvic organ prolapse. *Neurourol Urodyn.* 2004;23(2):119-26.
 56. Karam JA, Vazquez DV, Lin VK, Zimmern PE. Elastin expression and elastic fibre width in the anterior vaginal wall of postmenopausal women with and without prolapse. *BJU Int.* 2007;100(2):346-50.
 57. Goepel C. Differential elastin and tenascin immunolabeling in the uterosacral ligaments in postmenopausal women with and without pelvic organ prolapse. *Acta Histochem.* 2007;110(3):204-9.
 58. Liu X, Zhao Y, Gao J, Pawlyk B, Starcher B, Spencer JA, et al. Elastic fiber homeostasis requires lysyl oxidase-like 1 protein. *Nat Genet.* 2004;36(2):178-82.
 59. Lemmelä S, Forsman E, Onkamo P, Nurmi H, Laivuori H, Kivelä T, et al. Association of LOXL1 gene with Finnish exfoliation syndrome patients. *J Hum Genet.* 2009;54(5):289-97.
 60. Brookes AJ. The essence of SNPs. *Gene.* 1999;234(2):177-86.
 61. Wang DG, Fan JB, Siao CJ, Berno A, Young P, Sapolsky R, et al. Large-Scale Identification, Mapping, and Genotyping of Single-Nucleotide Polymorphisms in the Human Genome. *Science.* 1998; 280(5366):1077-82.
 62. Shastri BS. SNP Alleles in Human Disease and Evolution. *J Hum Genet.* 2002;47(11): 561-6.
 63. Jack GS, Nikolova G, Vilain E, Raz S, Rodriguez LV. Familial transmission of genitovaginal prolapse. *Int Urogynecol J.* 2006;17(5):498-501.
-

-
64. Carley ME, Schaffer J. Urinary Incontinence and Pelvic Organ Prolapse in Women with Marfan or Ehlers-Danlos Syndrome. *Am J Obstet Gynecol*. 2000;182(5):1021-3.
 65. Simpson LL, Athanassious AM, D'Alton ME. Marfan syndrome in pregnancy. *Curr Opin Obstet Gynecol*. 1997;9(5):337-41.
 66. Rodrigues AM, Girão MJBC, da Silva IDC, Sartori MGF, Martins KF, Castro RA. 2008. COL1A1 Sp1-Binding Site Polymorphism as a Risk Factor for Genital Prolapse. *Int Urogynecol J Pelvic Floor Dysfunct*. 2008;19(11):1471-5.
 67. Skorupski P, Miotła P, Jankiewicz K, Rechberger T. Polymorphism of the Gene Encoding Alpha-1 Chain of Collagen Type I and a Risk of Pelvic Organ Prolapse--a Preliminary Study. *Ginekol Pol*. 2007;78(11):852-5.
 68. Skorupski P, Jankiewicz K, Miotła P, Marczak M, Kulik-Rechberger B, Rechberger T. The Polymorphisms of the MMP-1 and the MMP-3 Genes and the Risk of Pelvic Organ Prolapse. *Int Urogynecol J*. 2013;24(6):1033-8.
 69. Neupane R, Sadeghi Z, Fu R, Hagstrom SA, Moore CK, Daneshgari F. Mutation screen of LOXL1 in patients with female pelvic organ prolapse. *Female Pelvic Med Reconstr Surg*. 2014;20(6):316-21.
 70. Vergeldt TFM, Weemhoff M, Int'Hout J, Kluivers KB. Risk Factors for Pelvic Organ Prolapse and Its Recurrence: A Systematic Review. *Int Urogynecol J*. 2015;26(11):1559-73.
 71. Brubaker L, Rickey L, Xu Y, Markland A, Lemack G, Ghetti C, et al. Symptoms of Combined Prolapse and Urinary Incontinence in Large Surgical Cohorts. *Obstet Gynecol*. 2010;115(2 Pt 1):310-6.
 72. Sze EH, Sherard GB, Dolezal JM. Pregnancy, Labor, Delivery, and Pelvic Organ Prolapse. *Obstet Gynecol*. 2002;100(5 Pt 1): 981-6.
 73. Leijonhufvud A, Lundholm C, Cnattingius S, Granath F, Andolf E, Altman D. Risks of stress urinary incontinence and pelvic organ prolapse surgery in relation to mode of childbirth. *Am J Obstet Gynecol*. 2011;204(1):70.e1-7.
 74. Bortolini MAT, Rizk DEE. Genetics of pelvic organ prolapse: crossing the bridge between bench and bedside in Urogynecologic research. *Int Urogynecol J*. 2011;22(10):1211-9.
 75. Dos Santos RGM, Pepicelli FCA, Batista NC, de Carvalho CV, Bortolini MAT, Castro RA. Collagen XVIII and LOXL-4 polymorphisms in women with and without advanced pelvic organ prolapse. *Int Urogynecol J*. 2018;29(6):893-8.
 76. Stern C. The Hardy-Weinberg Law. *Science*. 1943;97(2510):137-8.
-

77. Llorca J, Prieto-Salceda D, Combarros O, Dierssen-Sotos T, Berciano J. Riesgos competitivos de muerte y equilibrio de Hardy-Weinberg en estudios de casos y controles sobre asociación entre genes y enfermedades. *Gac Sanit.* 2005;19(4):321-4.
 78. Chen B, Cole JW, Grond-Ginsbach C. Departure from Hardy Weinberg Equilibrium and Genotyping Error. *Front Genet.* 2017;8:1-6.
 79. Stark AE. Stages in the evolution of the Hardy-Weinberg law. *Genet Mol Biol.* 2006;29(4):589-94.
-